Zur Physiologie der Methanbakterien.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Philosophischen :: Fakultät der Vereinigten Friedrichs- :: Universität Halle-Wittenberg vorgelegt von

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Eugen Münz
Schöneberg-Berlin.

Halle (Saale), Buchdruckerei von Heinrich John. 1915.

Referent: Herr Prof. Ernst Pringsheim.

Meiner treusorgenden Mutter
in Dankbarkeit gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546024_0106

Gliederung.

Seite

I. Einleitung 7
Ältere Ergebnisse und Stellung der Aufgabe . . . 7
II. Versuchsanstellung 10
Zusammenstellung der Versuche 10
Herstellung der Nährlösungen 13
Darstellung des Methans 14
Bestimmung der gebildeten organischen Stoffe . . 17
III. Kulturbedingungen 18
Gewinnung der Kulturen 18
Form der Gefäße 20
Nährlösung 23
Gasgemisch 28
Temperatur 36
Licht, Zeit und andere Faktoren 40
IV. Beschreibung der kultivierten Bakterien 44
Methanbakterien 44
Begleitbakterien 46
V. Ersatz der Stoffe 49
Vertretung des Methans durch andere Gase . . . 49
Verwertbarkeit organischer Substanzen 52
VI. Erörterung der Ergebnisse 54
Die Ergebnisse im Hinblick auf den bisherigen Tatsachenbestand 54
Die Lebensweise in der Kultur und unter natürlichen Bedingungen 56
Vergleich mit anderen autotrophen Bakterien . . . 57
VII. Zusammenfassung 58
VIII. Literatur 60

I. Einleitung.

Ältere Ergebnisse.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß auf dem Grunde der Gewässer ständig ganz beträchtliche Mengen von Sumpfgas entstehen. Sie rühren im wesentlichen her von der Zersetzung von Cellulosemassen. Die Blätter der Bäume und Sträucher fallen häufig ins Wasser und sinken hier schließlich zu Boden; außerdem liegen am Grunde oft erhebliche Mengen abgestorbener Teile von Wasserpflanzen. Beide werden vielfach von Schnecken gefressen und ihrer verdaulichen Bestandteile beraubt. Ihre Zellwände unterliegen dann unter Mitwirkung von Bakterien einer Gärung, die man wohl auch als „Methangärung der Cellulose" bezeichnet. Da das Wasser den Sauerstoffzutritt erschwert, findet die Zersetzung unter anaëroben Bedingungen statt, wobei eine restlose Aufspaltung der Cellulose erreicht wird. Außer Butter- und Essigsäure entstehen dabei große Mengen von Methan und Kohlendioxyd.

Es liegt nahe, daß man im Lauf der Zeit auf die Frage stieß, was wohl mit diesen gewaltigen Mengen Methan geschehe; denn trotz der beständigen Entwickelung dieses Gases nimmt sein Prozentgehalt in der Atmosphäre nicht zu. Daß das Methan auf rein chemischem Wege aus der Luft verschwinden könne, war eine Möglichkeit, die nicht fern lag, und so trat man denn von dieser Seite an die Lösung der Frage heran: man versuchte durch chemische Experimente Aufklärung zu schaffen.

Es scheint, daß man an der Aufklärung der Sachlage an verschiedenen Stellen und zu verschiedenen Zeiten unabhängig von einander gearbeitet hat. Ob aber die zeitlich nachfolgenden Lösungen ohne Anregung durch schon vorhandene Ergebnisse erzielt wurden, vermag ich nicht zu sagen. Gewiß ist, daß im Jahre 1901 zum ersten Mal mit der Lösung der Frage begonnen wurde.

In diesem Jahre teilte V. Urbain in der Schrift: „De l'élimination du méthane dans l'atmosphère“ (1) seine Ergebnisse in der französischen Akademie mit. Urbain fand, daß, wenn man Luft, die 1 Proz. Methan enthält, durch einen Berthelot'schen Ozonisator leitet, das Methan zum Teil oxydiert wird; allerdings wurde kaum ein Drittel des Methans auf diese Weise zum Verschwinden gebracht. Übrigens findet sich in dem „Lehrbuch der anorganischen Chemie“ von H. Erdmann eine entsprechende Bemerkung. Es heißt hier vom Sumpfgas: „ . . . Trotz dieser mächtigen natürlichen Quellen, welche ständig Methan aushauchen, findet es sich nur spurenweise in der Luft, weil es in den oberen Schichten der Atmosphäre durch das sich dort unter dem Einfluß der Sonnenstrahlung bildende Ozon oxydiert wird“. — Durch diese Ergebnisse nicht befriedigt, suchte Urbain nach einem anderen Ausweg. Er vermutete, daß vielleicht Pflanzen bei dem Verschwinden des Methans in Betracht kommen könnten und hielt es für möglich, daß diese Organismen gegenüber dem Methan sich ähnlich verhalten könnten, wie es bei der Kohlensäure der Fall ist; demnach dachte er an eine Art Methan-Assimilation grüner Pflanzen im Lichte. Um die Verhältnisse aufzuklären, ging er in folgender Weise vor: er brachte unter geräumige Glasglocken Pflanzen, deren Wurzeln in feuchten Sand eingesenkt waren. Da nichts darüber angegeben ist, darf man wohl annehmen, daß es sich um Landpflanzen handelt. Das unter der Glocke befindliche Gasgemisch bestand aus Luft mit bestimmten Mengen von Methan. Nach etwa 8 bis 14 Tagen wurde das Gasgemisch geprüft und Methanverlust festgestellt. Wegen der wenig einheitlichen Ergebnisse verfolgte Urbain die Frage nicht weiter, kam aber auf Grund der erlangten Erfahrungen zu dem Schlusse, daß die Pflanzen in erheblichem Maße für das Verschwinden des Sumpfgases verantwortlich gemacht werden müßten.

Nach diesen von 1895 bis 1901 ausgeführten Untersuchungen vergingen einige Jahre, ohne daß eine bestimmtere Entscheidung der Frage gefällt wurde. Inzwischen waren die Arbeiten von Winogradsky über Nitrifikation erschienen, die zeigten, daß es Bakterien gibt, die in anorganischer Nährlösung zu gedeihen vermögen.

Im Jahre 1905 haben sich dann zwei Bakteriologen mit einschlägigen Versuchen beschäftigt, unabhängig von einander, wie es scheint. Unter Anleitung von Prof. Beijernick in Delft nahm N. L. Söhngen (2) neue Untersuchungen in Angriff, während

in Wien Kaserer (3) an der Lösung der Frage arbeitete. Ob durch die Urbainschen Versuche Anregungen dazu gegeben worden sind, ist aus diesen beiden Arbeiten nicht zu ersehen; jedenfalls stellte Söhngen fest, daß in einem Kolben, in dem sich Wasserpflanzen (Elodea, Potamogeton, Batrachium, Callitriche, Hottonia, Spirogyra) unter einer Methan-Luftatmosphäre befanden, Methanabsorption vor sich ging. Das Verschwinden von Methan wurde gasanalytisch festgestellt. Wurden die Wasserpflanzen sorgfältig abgewaschen, so verlangsamte sich der Prozeß der Methanabsorption. Söhngen kam zu der Vermutung, daß das Verschwinden des Methans ein biologischer Vorgang sei, der von Bakterien verursacht werde; erst wenn sich eine Haut auf der Oberfläche der Kulturflüssigkeit zeigte, setzte der Prozeß der Absorption lebhaft ein. Der genannte Forscher versuchte nun, das zu Grunde liegende Bakterium anzuhäufen, indem er es in einer anorganischen Nährlösung kultivierte. Dazu verwendete er eine Gasmischung von zwei Drittel Luft und ein Drittel Methan und infizierte mit Jauche, Gartenerde oder Grabenwasser. Durch wiederholte Überimpfung gelangte er zu anscheinend reinen Kulturen des Bakteriums, das er „Bacillus methanicus“ nannte.

Kaserer gibt in einer Arbeit über Wasserstoffbakterien nur Andeutungen von wenigen Zeilen über Methanbakterien; er bringt eigentlich nur die Tatsache, daß solche Bakterien existieren.

Diese Ergebnisse von Söhngen und Kaserer wurden bald darauf von Giglioli und Masoni (4), die zu dem Ergebnis kommen, daß die Methanbakterien sich in verschiedenen Erdschichten verschieden gut entwickeln und daß es verschiedene Arten von Methanbakterien gibt, die bei verschiedenen Temperaturen gedeihen, bestätigt. Außer diesen Experimenten über Methanbakterien findet sich bei Söhngen noch eine Bemerkung über das Verhältnis gewisser farbstoffbildender Wasserstoffbakterien zum Methan, die sich auch in einem Buch von Stockhausen über Ökologie (5) findet (S. 265):

„ . . . . Neben Bacillus methanicus sind noch andere Arten imstande, Methan als Kohlenstoffquelle zu verwerten. So war Bacillus pyocyanëus ein ständiger Begleiter des Bacillus methanicus und kam in den Methan absorbierenden Kulturen so regelmäßig vor, daß der Anhäufungsversuch des Bacillus methanicus zugleich eine ausgezeichnete Anhäufungsmethode für Bacillus pyocyanëus ist, indem dieser Mikrobe Methan in gleicher Weise als Kohlenstoff-

und Energiequelle gebrauchen kann; dasselbe gilt von der Gruppe der Fluorescenten und einigen Vertretern der Aërobakterpruppe. . . ."

Ich werde weiter unten, in dem Abschnitt über die Begleitbakterien, zu dieser Behauptung Stellung nehmen.

Die bisher erzielten Ergebnisse bedurften noch mannigfacher Ergänzungen. So fehlten systematische Untersuchungen über das Wachstum bei verschiedenen Mengenverhältnissen der Gase. Außer dem Einfluß verschiedener Nährlösungen galt es auch den der Temperatur und des Lichtes zu prüfen. Es mußte ferner die Frage der Autotrophie mit besonders vorsichtiger Versuchsanstellung erledigt werden. Hier knüpfen weitere Untersuchungen an: ist es möglich, das Methan zu ersetzen, sei es durch andre Gase oder durch organische Stoffe? Die Möglichkeit, daß es verschiedene Arten von Methan zehrenden Organismen gibt, war nicht ausgeschlossen. Eine genaue Beschreibung der Methanbakterien fehlte bisher. Bei einzelnen Punkten können noch Unterfragen gestellt werden, sodaß für nähere Untersuchungen genügend Stoff vorhanden war.

II. Versuchsanstellung.

Zusammenstellung der Versuche.

Um die Methanbakterien heranzuzüchten, schlug ich den von Söhngen und Kaserer angegebenen Weg ein. Zunächst wurden die Bakterien in Rohkulturen angehäuft. Als Kulturgefäße benutzte ich gewöhnliche Erlenmeyerkolben, die oben mit doppelt durchbohrtem Gummistopfen verschlossen waren.

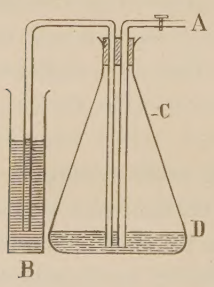


Fig. 1.

(Fig. 1). Durch die eine Bohrung (A) läuft das Gaszuleitungsrohr, während die zweite ein ähnliches, zwei Mal winkelig gebogenes Rohr (B) trägt, das zum Ausgleich des Druckes dient. Söhngen verwendete einen ähnlichen Apparat, dessen Abbildung er gibt (2). Mit ihm mag es sich wohl noch etwas sauberer arbeiten lassen, vor allem, weil er gar keine Gummiverbindungen enthält, sondern ganz aus Glas

besteht; doch genügte für Zwecke wie den der Rohkultur der etwas einfachere Apparat, wie ihn Fig. 1 zeigt. Der Kolben wurde zunächst mit einer anorganischen Nährlösung gefüllt, wie sie Söhngen und Kaserer benutzten. Sie wählten etwas verschiedene Zusammensetzung, nämlich

Söhngen:		Kaserer:	
$Mg NH_4 PO_4$	0,1	$NH_4 Cl$	0,1
$K_2 HPO_4$	0,05	$K_2 HPO_4$	0,05
$Mg SO_4$	0,02	$Mg SO_4 + 7 H_2O$	0,02
Destill. H_2O	100	$Fe Cl_2$	Spur
		Destill. H_2O	100

Man erhält mit beiden Flüssigkeiten schönes Wachstum. Ich zog jedoch späterhin die von Kaserer angegebene Zusammenstellung vor, da sie nur einen schwachen Bodensatz enthält, während das Ammoniummagnesiumphosphat sich nur in Spuren löst. Das Kulturgefäß wurde soweit gefüllt, daß im oberen Teil noch ein Rest blieb, dessen Volumen ich nach der Quantität der dem Gasgemisch beizumengenden Luft bemaß. Da von Söhngen das Verhältnis ein Drittel Methan: zwei Drittel Luft angegeben war, während Kaserer nichts darüber mitteilt, so stellte ich meine Versuche zunächst mit einer solchen Gasmischung an. Der Boden des Kolbens sollte mit der Kulturflüssigkeit bedeckt bleiben, der Hauptteil des Innenranms aber mit dem Gasgemisch gefüllt werden. Daher wurde der Kulturkolben zu etwas mehr als ein Drittel seines Innenraumes mit der Nährlösung gefüllt und dann diese bis auf eine niedrige Schicht durch Methan verdrängt, nachdem mit Grabenwasser, Schlamm oder Gartenerde geimpft und das Gefäß durch den Stopfen geschlossen worden war. Durch das Zuleitungsrohr (A) wurde dann das Methan eingeleitet. Damit die Möglichkeit der Verdrängung der Flüssigkeit bestand, mußte das Ableitungsrohr (B) bis in die Flüssigkeit hineinragen. War so die Flüssigkeit bis auf einen kleinen Rest durch Methan verdrängt, so wurde das Zuleitungsrohr (A) geschlossen. Um das Gasvolumen abzusperren, da es ja noch durch das Rohr B mit der Luft in Verbindung stand, und damit später der Raum des absorbierten Gases zur Vermeidung von Unterdruck wieder mit Flüssigkeit gefüllt wurde, brachte ich noch ein zweites Gefäß an, das mit der gleichen Kulturflüssigkeit gefüllt war, und in das das Rohr B eintauchte. Der so hergerichtete Kulturkolben wurde nun in einen Thermostaten von etwa 34° Celsius gebracht. Diese

Temperatur wurde in Übereinstimmung mit Söhngen gewählt, der 30°—37° Celsius als günstigen Wärmegrad bezeichnet. Da hierbei der Temperaturwechsel und dementsprechend die Ausdehnung des Gases ziemlich beträchtlich ist, so hat man darauf zu achten, daß zunächst das Schenkelrohr B etwas emporgezogen wird, soweit bis es nicht mehr in die Flüssigkeit im Kolben eintaucht, weil diese sonst unter Umständen durch den Druck des sich ausdehnenden Gases ganz herausgepresst wird. Wenn die Kulturen dann einige Zeit im Thermostaten gestanden haben und der Überdruck in dem Kolben sich durch das Entweichen von Gas aus dem Schenkelrohr B ausgeglichen hat, so kann dieses wieder in die Flüssigkeit des Entwicklungskolbens eingetaucht werden. Das von den Bakterien verbrauchte Gas wird nun ersetzt durch die in das Schenkelrohr (B) von dem Nebengefäß her aufsteigende Flüssigkeit.

Genügte diese Versuchsanordnung für den Zweck der Rohkultur, so war doch für genauere Untersuchungen, wie zum Beispiel die Herstellung der Reinkultur oder die Versuche mit verschiedenen Gasgemischen, eine andere Anordnung nötig, die die Verwendung größerer Gasmengen und das Nachfüllen von Gas besser ermöglichte. Hierzu benutzte ich Glasglocken (Fig. 2) von 2000 bis 3000 ccm Inhalt, die an der Unterseite mit einem Schliff versehen waren, durch Zuhülfenahme von Fett luftdicht auf Glasplatten aufgesetzt werden konnten und dadurch ein Auspumpen bis auf ganz geringe Luftreste ermöglichten. Den Verschluß nach oben hin erreichte ich mit Hülfe von Gummistopfen, deren Dichtung mit Siegellack noch gesichert wurde. Wie bei dem vorher beschriebenen Apparat befindet sich auch hier ein Ausgleichgefäß (C) außerhalb der Glocke, unter die die Kulturen in ziemlich großer Anzahl gebracht werden konnten. Ebenso befindet sich noch innerhalb der Glocke ein Gefäß (B), das zur Aufnahme des bei Gasabsorption eingesogenen Wassers dient. Das am Ende des Versuchs im innern Gefäß (B) befindliche Wasser gibt ungefähr das Volumen des von den Bakterien verbrauchten Gases an. Auch hier entströmt ein Teil des Gases nach Einbringung des Apparates in den Thermostaten durch das Schenkelrohr. Man hat dieses unter Umständen bei Volumenberechnungen zu beachten, es können sonst ziemlich erhebliche Fehler entstehen, da bei 34° ein Volumen von 2000 ccm sich um 110 ccm vergrößert, so daß also 110 ccm durch das Rohr

(B) nach außen strömen. Auf jeden Fall hat man durch diese Versuchsanordnung erreicht, daß der Druck in der Gasglocke immer annähernd 1 Atm. bleibt. Zur weiteren Herrichtung der Glocke für die Versuche wird diese, nachdem sie luftdicht auf die Glasplatte aufgesetzt worden ist, nach Schließen des Hahnes A bis auf die gewünschte Verdünnung ausgepumpt, die sich nach dem Prozentgehalt an Luft richtet, den man beabsichtigt. Dann wird der Hahn bei D geschlossen und das Vakuum langsam mit Methan aufgefüllt. Daß das Auspumpen, selbst bei einer Verdünnung der Luft auf ein Fünfzigstel, den Bakterien geschadet hätte, habe ich nie beobachtet. Nach der Füllung wird das Rohr B in das Ausgleichgefäß (C) eingetaucht und in den Thermostaten gestellt. Diese Methode hat den Vorteil, daß sie, außer größerer Sauberkeit, erheblich ausgiebigeres Arbeiten gestattet; meist brauchten die Glocken, falls nicht zu viele Kulturen darin untergebracht waren, während der Versuchsdauer nur ein bis zwei Mal gefüllt zu werden.

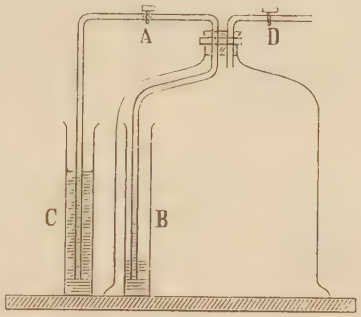


Fig. 2.

Herstellung der Nährlösungen.

Die verwendeten Nährlösungen wurden durch Verdünnen stärkerer Vorratslösungen hergestellt. Die zur Kultur verwendeten Gefäße wurden nach sorgfältigem Reinigen mit Chromschwefelsäure und darauffolgender Spülung mit Leitungswasser und destilliertem Wasser mit Nährlösung versehen und im Autoklav unter einem Druck von zwei Atmosphären sterilisiert. Auf langsames Abkühlen des Drucktopfes wurde besonders geachtet, um Infektion der sterilen Lösungen durch Einsaugen von Keimen zu vermeiden. Besonders reine Salze mußten verwendet werden, wo es sich um die Feststellung der Autotrophie der Methanbakterien sowie um die Bestimmung des Gewinnes an organischen Stoffen in der Nährlösung handelte. In diesen Fällen wurde auch das käufliche destillierte Wasser durch nochmalige Destillation gereinigt.

Methandarstellung.

Söhngen stellte das Methan aus Methyljodid dar, doch war mir diese Methode viel zu kostspielig; außerdem liefert sie auch kein reines Methan. So griff ich zu einer billigeren Quelle. Man kann das Methan auf zwei Wegen gewinnen, entweder aus Natriumacetat oder aus Aluminiumcarbid.

Darstellung aus Natriumacetat.

Man erhitzt Natriumacetat und Bariumhydroxyd, beide fein gepulvert, und erhält dadurch ein ziemlich verunreinigtes Methan. Ich reinigte es, indem ich es durch Bromwasser und Natronlauge leitete; das Bromwasser nimmt die ungesättigten Kohlenwasser-

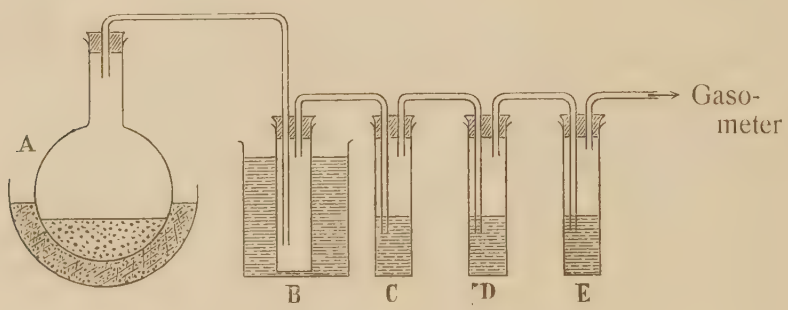


Fig. 3.

stoffe auf, die Natronlauge die Kohlensäure. In Fig. 3 ist die Versuchsanordnung angedeutet. Im Kolben A befindet sich das Gemenge der Ausgangsstoffe, Natriumacetat und Baryumoxyd, das dazu dient, dem Acetat die Kohlensäure zu entreißen; es wird erst bei ziemlich hoher Temperatur zersetzt. Zum Zweck gleichmäßiger Erhitzung beim Beginn und gleichmäßiger Abkühlung am Ende des Prozesses verwendete ich ein Sandbad. Das entstehende Gasgemisch wird zuerst in ein nur mit Luft gefülltes Gefäß (B) geleitet, das mit Wasserkühlung versehen ist. Hier schlägt sich im wesentlichen Wasserdampf, der zum Teil dem Acetat, zum Teil aber auch dem Baryumoxyd entstammt, nieder; außerdem gewährt dieses Gefäß noch Sicherheit gegen das Zurücksteigen der Flüssigkeiten aus den übrigen Gefäßen in den heißen Entwicklungskolben A.

Der Gasstrom geht erst durch das Bromwasser (C), dann durch die zweite Waschflasche (D), die Wasser enthält, um den Hauptteil des übergehenden Broms zurückzuhalten, so daß nur ein geringer Teil davon noch die folgende Flasche mit Kalilauge (E) erreicht. Diese kann dadurch länger und sicherer ihre Hauptaufgabe, die Kohlensäure zurückzuhalten, erfüllen, als wenn sie auch noch das Brom zu binden hätte. Das so erhaltene, von den Verunreinigungen befreite Methan wird im Gasometer über Wasser aufgefangen.

Was mich veranlaßte, diese Art der Methandarstellung schließlich aufzugeben und mich einer anderen zuzuwenden, ist besonders die Tatsache, daß die Zersetzung des Natriumacetats verhältnismäßig geringe Gasmengen liefert. Da ich nun jedes Mal etwa 10 bis 15 Liter Methan herzustellen hatte und das Verfahren oft wiederholen mußte, war ein ausgiebigerer und bequemer einzuleitender Prozeß sehr erwünscht, bei dem auch die hohen Hitzegrade vermieden wurden, wie sie die Zersetzung des Natriumacetates erfordert. In der Zersetzung des Aluminiumcarbids durch Wasser bot sich mir eine bequemere Darstellungsmethode für das Methan.

Darstellung aus Aluminiumcarbid.

Das Rohmaterial hierzu ist das bei Kahlbaum käufliche Aluminiumcarbid. Es hat den großen Vorteil, daß zu seiner Zersetzung nur Wasser von kaum 100° Cels. nötig ist. Ich ging so vor, daß ich in einem Glaskolben das Gemisch von Carbid und Wasser langsam in einem Wasserbade erhitzte bis fast zum Kochen des Wassers. Die Gasentwickelung geht, falls das Wasser nur etwa auf 90° gebracht wird, sehr schön regelmäßig vor sich. Fig. 4 zeigt den zur Gasentwickelung nötigen Aufbau. Das Gas wird im Kolben A entwickelt; es ist jedoch nicht rein und muß daher einige Absorptionsgefäße durchströmen. Außer geringen Mengen ungesättigter Kohlenwasserstoffe entsteht auch etwas Ammoniak bei dem Prozeß, der nach der Gleichung

$$Al_4C_3 + 12\,H_2O = 3\,CH_4 + 4\,Al(OH)_3$$

verläuft. Die neben CH_4 entstehenden Kohlenwasserstoffe rühren wohl daher, daß das zur Herstellung des Carbids verwendete Aluminium nicht rein ist. Ist Calcium beigemengt, so können Spuren von Acetylen entstehen; in der Tat hatte das ungereinigte

Gas einen schwachen Acetylengeruch. Das entstehende Ammoniak mag wohl aus der verwendeten Kohle oder aus gebundenem Luftstickstoff stammen. Um die ungesättigten Kohlenwasserstoffe zu entfernen, verwendete ich rauchende Schwefelsäure. Diese befindet sich in den mit Bimstein angefüllten U-Rohren (Fig. 4: C, D). Die Schwefelsäure bindet außerdem das Ammoniak. Das letzte U-Rohr (E) ist mit Kalilauge gefüllt und hält etwa mitgerissene Schwefelsäureteilchen zurück. Das erste Gefäß (B) dient, wie schon oben, zur Kondensation von Wasserdampf, was hier besonders wichtig ist, um eine zu starke Verdünnung der rauchenden Schwefelsäure zu verhindern, und als Sicherung gegen

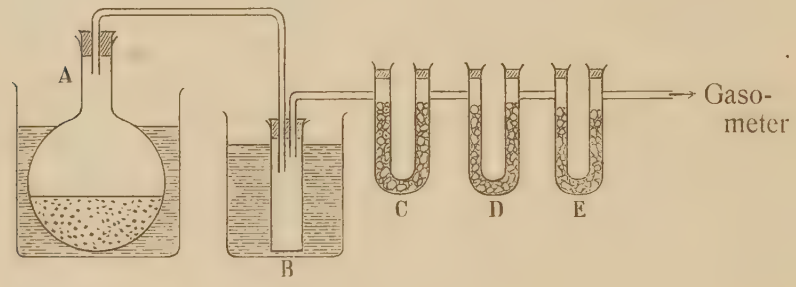


Fig. 4.

das Zurücksteigen der Flüssigkeiten. Die ungesättigten Kohlenwasserstoffe werden nur dann vollständig durch die Schwefelsäure absorbiert, wenn das Gas langsam durch die U-Rohre strömt, so daß hierfür besonders Sorge zu tragen ist. Da sich anfangs noch erhebliche Mengen von Luft im Apparat befinden, ließ ich zunächst immer längere Zeit die Gasentwickelung vor sich gehen, ohne das entstehende Methan aufzufangen. Um möglichst vollständige Reinigung zu erzielen, leitete ich das Gas, wenn es vom Gasometer in die Glocken gefüllt wurde, noch einmal durch die Absorptionsrohre. Das entwickelte Gas ist, wenn es so gereinigt wird, völlig geruchlos. Im Ganzen verbrauchte ich 3 kg Aluminiumcarbid; das Volumen des für die Versuche insgesamt entwickelten Methans betrug etwa 520 Liter.

Bestimmung der gebildeten organischen Stoffe.

Um das Maß des Wachstums zahlenmäßig festzustellen, wendete ich die Methode der Titration mittelst Kaliumpermanganat an. Ich erhielt dadurch allerdings keine absoluten sondern nur relative Werte für die Mengen der gebildeten organischen Stoffe; doch genügt das, um die Autotrophie sicherzustellen und einen Einblick in die Stärke der Vermehrung meiner Bakterien unter verschiedenen Bedingungen zu gewinnen. Bei diesem Verfahren wurden die Bakterienhäute zusammen mit den in der Kulturflüssigkeit gelösten organischen Stoffen titriert. Vor Ausführung der Versuche war es nötig, sich darüber zu vergewissern, daß die Kulturflüssigkeit vor der Kultur der Bakterien keine Reduktionswirkung ausübte, was in der Tat auch nicht der Fall war. Die Titrationen wurden in schwefelsaurer Lösung vorgenommen. Die Wahl des Faktors der Permanganatlösung ist von untergeordneter Bedeutung, da es sich nur um die Feststellung relativer Zahlenwerte handelt; ich benützte eine Lösung von 0,01 n. Der Faktor der Lösung wurde an jedem Titrationstage mit einer Oxalsäurelösung von ungefähr gleichem Faktor neu geprüft, da sich die Konzentration des Permanganats an der Luft ständig ändert: es bildet sich ein Satz von MnO_2, das unlöslich ist und für die Oxydationswirkung nicht mehr in Betracht kommt. Beide Lösungen wurden verschlossen im Dunkeln aufbewahrt und nie länger als 14 Tage benützt, da die Oxalsäurelösung sich ebenfalls nicht viel länger hält infolge der Infektion mit Pilzen. Die durch die Änderung des Faktors hervorgerufenen Schwankungen wurden dann auf gleichen Faktor umgerechnet. Die Lösungen wurden in Mohrsche Büretten abgefüllt und der Verbrauch auf 0,1 ccm genau abgelesen. Da die Möglichkeit besteht, daß schwer oxydierbare Substanzen vorhanden sind, genügte es nicht, eine direkte Titration der organischen Substanzen vorzunehmen. Es wurde daher zu der Flüssigkeit, die titriert werden sollte, eine bestimmte Menge Permanganat zugesetzt, so daß ein Überschuß vorhanden war. Dann ließ ich das Oxydationsmittel 24 Stunden wirken und titrierte darauf mit Oxalsäure bis zur Entfärbung des Permanganats zurück. Durch Subtraktion erhielt ich so die zur Oxydation der organischen Stoffe verbrauchte Menge Permanganat. Meist wurden die Zusätze von Permanganat morgens vorgenommen; gegen Abend zeigte sich dann schon eine Aufhellung

bezw. Entfärbung der Flüssigkeit, so daß, falls der Überschuß an Permanganat zu gering gewesen war, gleich nachgefügt werden konnte, wodurch falsche Ergebnisse in dieser Hinsicht vermieden wurden. Daß man nur relative Werte erhält, ist auch noch daraus zu entnehmen, daß die in 24 Stunden nicht oxydierten Stoffe unberücksichtigt bleiben. So besteht die Möglichkeit, daß die Bakterienzellhäute nicht angegriffen werden. Ich filtrierte, um diesen Fall zu untersuchen, die Flüssigkeiten einiger Kulturen sorgfältig von den Bakterien-Kahmhäuten ab und wusch diese, um sie von den Resten der Kulturflüssigkeit zu befreien, zweimal mit destilliertem Wasser aus. Dann brachte ich die Häute in Kelchgläser und fügte genügende Mengen von Kaliumpermanganat mit Schwefelsäure hinzu. Nach 24 Stunden zeigte sich in der obern Schicht der Flüssigkeit, auf der die Bakterienhäute schwammen, eine Entfärbung des violetten Oxydationsmittels, während die Häute, aus denen offenbar noch organische Stoffe herausgelöst worden waren, zurückblieben. Ich schüttelte die Flüssigkeit durcheinander und ließ noch 24 Stunden das Permanganat einwirken. Es war noch eine schwache Aufhellung der Flüssigkeit bemerkbar, doch waren die Häute nach wie vor geblieben, was sich schon mit bloßem Auge feststellen ließ. Hierdurch ist gezeigt, daß nicht die Gesamtmenge der in der Kulturflüssigkeit vorhandenen organischen Stoffe oxydiert wird; der Nachweis, daß die zur Zeichnung der Kurvenbilder festgestellten Zahlen nur relative Werte darstellen, ist also auch von dieser Seite aus erbracht. Auf die möglichen Fehlerquellen bei diesem Verfahren der Feststellung der gebildeten organischen Substanz komme ich unten zurück.

III. Kulturbedingungen.

Gewinnung der Kulturen.

In die nach der obigen Beschreibung (Fig. 1) hergestellten Erlenmeyerkolben impfte ich in die beiden verschiedenen anorganischen Nährlösungen. Als Impfmaterial benutzte ich Gartenerde, Grabenwasser, Blattstückchen von Wasserpflanzen (Potamogeton,

Elodea, Vallisneria) und Schlamm vom Grunde eines Gewässers. Ich erhielt mit allen diesen Stoffen Wachstum, allerdings nicht immer gleich ausgiebig und schnell. Am wenigsten eignete sich Gartenerde, während mit Flußschlamm innerhalb weniger Tage starkes Wachstum erfolgte. Es bildete sich eine Kahmhaut, die eine ziemlich beträchtliche Stärke besaß. Zur Kontrolle wurden außer den sechs mit Methan/Luft gefüllten Kolben (drei mit der in Abschnitt II erwähnten Lösung mit NH_4Cl, drei andere mit der $MgNH_4PO_4$ enthaltenden Lösung) sechs weitere angesetzt unter genau denselben Bedingungen: 34° Celsius, anorganische Nährlösung, gleiche Impfung, aber ohne CH_4, während die sechs ersten Kolben ein Gasgemisch von ein Drittel Methan und zwei Drittel erhielten. Geimpft wurde in beiden Fällen mit möglichst wenig Material, um durch ein Minimum der durch Impfung hineingebrachten Stoffe die anderen Organismen möglichst zurückzudrängen. So oft ich den Versuch wiederholte, was etwa 15 bis 20 Mal geschah, stets erhielt ich das gleiche Ergebnis: während die Kontrollkölbchen eine äußerst spärliche Bakterienentwickelung zeigten, konnte in den mit Methan versehenen Kolben mit wenigen Ausnahmen schon nach drei Tagen eine ziemlich starke Haut wahrgenommen werden. Meist zeigte sich dann eine schwache Trübung der Flüssigkeit. Die entstandene Kahmhaut enthielt fast nur Methanbakterien. Ich impfte davon auf ein gleichartiges Medium ab, das zunächst nicht sterilisiert wurde, da sich diese Kulturkolben schlecht dazu eignen, und griff nach einigen Überimpfungen zur Impfung auf sterile Nährlösung. Zu diesem Zweck benutzte ich den in Fig. 2 dargestellten Apparat. Kleine runde Glasschälchen mit flachem Deckel erwiesen sich für diese Versuche als sehr geeignet, da sie sich in größerer Zahl unter die Glocken bringen lassen als etwa Erlenmeyerkölbchen. Es empfiehlt sich, von nicht zu alten Kulturen abzuimpfen; man erhält schneller Wachstum, wenn man von jüngerem Material ausgeht. Daß in diesen Methanbakterienkulturen im Lauf der Zeit ziemlich große Mengen von organischen Stoffen angehäuft werden, hat schon Söhngen durch Titration mit Permanganat nachgewiesen. Mit Hülfe derselben Methode fand ich z. B. in drei Rohkulturen nach zehn Tagen Entwickelung folgende Zahlen: 25 ccm Kulturflüssigkeit verbrauchten 37,5, 39,1, 30,0 ccm 0,02 n Permanganat. Nachdem die Bakterien einige Male in angegebener Weise übergeimpft worden waren, schritt ich zur Herstellung der Reinkultur.

Ich benutze hierzu einen Nährboden von 1,8% ausgewaschenem Agar mit Zuzatz anorganischer Salze: NH_4Cl . . . 0,1%; K_2HPO_4 . . 0,05%; $MgSO_4 + 7H_2O$ . . . 0,02%. Nach der Koch'schen Methode wurden die Bakterien in sterilen Agar, der verflüssigt und bis auf 42° Celsius abgekühlt war, geimpft und in sterile Petrischalen ausgegossen. Die Petrischalen wurden darauf in einem Gasgemisch von ein Drittel Methan und zwei Drittel Luft in Glocken bei 34° kultiviert. Dann wurde von den erhaltenen Kolonieen auf sterile Schälchen in anorganische Lösung abgeimpft und die darin nicht wachsenden Kulturen ausgeschieden. Das Verfahren des Plattengießens wurde einige Male wiederholt.

Form der Gefäße.

Um den Einfluß der richtigen Lebensfaktoren auf das Gedeihen der Methanbakterien studieren zu können, mußte für ihre Vermehrung ein Maß ausfindig gemacht werden, als welches ich die Produktion der durch Permanganat oxydierbaren organischen Stoffe verwendete. Die oben geschilderte Titrationsmethode gibt eine zuverlässigere Vergleichsmöglichkeit als der bloße Augenschein. Für jeden Versuch wurden vier Kulturen angesetzt. Je zwei Kulturen wurden dann zusammengegossen und ergaben einen Durchschnittswert; die beiden Durchschnittswerte lieferten ihrerseits wieder einen Durchschnittswert, der die Menge des verbrauchten Permanganats angab. Es kann leicht vorkommen, daß Teile der Bakterienhaut am Kulturgefäß haften bleiben; daher wurde jedes Schälchen zwei Mal mit destilliertem Wasser ausgespült und das Waschwasser zum Übrigen gefügt.

Dieses Vorgehen ergab befriedigend übereinstimmende Werte, wenn alle Bedingungen gleich gehalten wurden. In dieser Beziehung tauchten aber zuerst Schwierigkeiten auf durch die Einflüsse, die von der nicht ganz gleichen Form der Gefäße ausgingen. Hier mußte also eine besondere Untersuchung einsetzen, aus der hervorging, daß bei den Methanbakterien nicht wie sonst vielfach, die Produktion an organischer Substanz bei gleicher Nährlösung fast ausschließlich von deren Volumen abhängt. Die letztgenannte Erfahrung ergibt sich aus einigen Arbeiten über den Einfluß der Nährstoffmenge auf die Entwickelung von Organismen, von denen sowohl Pilze als Bakterien daraufhin untersucht worden sind. Besonders ist die neueste Arbeit von

E. G. Pringsheim (7) zu nennen, die eine ganze Anzahl von Literaturangaben enthält und an der ich mich über die Frage der Abhängigkeit des Wachstums von der Nährstoffmenge orientierte. Es handelt sich in letztgenannter Arbeit um das Wachstum von Pilzen in Nährlösungen; hierbei wurde in jeden Kulturkolben ein gleiches Volumen Flüssigkeit eingefüllt. Die Versuche ergaben angenäherte Proportionalität zwischen Ernte und Volumen, und ich glaubte daher anfangs, ähnlich verfahren zu müssen. Bei dem Versuch, so zu rechnen, fiel mir auf, daß die Zahlen für die gefundene Menge Permanganat nur äußerst mangelhaft, in manchen Fällen sogar in keiner Weise in Beziehung gebracht werden konnten. Die folgende Tabelle zeigt eine Anzahl von Beispielen (1 und 2 sind dabei Kulturen desselben Versuchs):

Verbrauch an Permanganat		Volumen der Kulturflüssigkeit	
1.	2.	1.	2.
10,4	8,8	61,2	92,4
8,3	8,7	55,1	42,3
6,3	6,1	30,1	58,0
7,6	14,6	40,0	50,8
5,7	4,9	50,3	60,2
4,0	4,7	35,0	60,4

Schon die erste horizontale Reihe ergibt große Unstimmigkeiten: nimmt man den Verbrauch von 10,4 ccm Permanganat auf ein Volumen von 61,2 ccm Kulturflüssigkeit als ein Paar von von zugehörigen richtigen Werten an, so gehörte zu 8,8 ccm Permanganat ein Volumen von etwa 49 ccm Kulturflüssigkeit und nicht 92,4 ccm. Die dritte Horizontalspalte zeigt, daß die Permanganatmengen fast gleich sind, während die Volumina im Verhältnis 2 : 1 stehen. Auch die übrigen Spalten zeigen keine Übereinstimmung in den Zahlenwerten. Das Volumen der Kulturflüssigkeiten konnte daher bei der Berechnung für Titration nicht ausschlaggebend sein. Eine kurze Überlegung brachte mich auf die allem Anschein nach richtige Lösung, die, abgesehen von ihrer unbedingten Notwendigkeit für die Beurteilung sämtlicher

Versuche, der Frage auch ein gewisses theoretisches Interesse verleiht. In den früher untersuchten Fällen fanden die Pilze in der Lösung alle Nährstoffe; daher ist das Volumen der Flüssigkeit von ausschlaggebender Bedeutung, und es mußte von vornherein ein bestimmtes Verhältnis zwischen Nährlösungsmenge und Ernte erwartet werden. Ganz anders sind aber die Verhältnisse bei den Methanbakterien, wo die Ernährungs- und Energiequelle in Form eines Gases vorliegt. Das Methan löst sich aber nur sehr wenig in Wasser; nach Bunsen löst ein Volumen H_2O bei t^0 nur

$$0{,}054 - 0{,}0018\ t + 0{,}00001\ t^2 - \ldots .$$ Volumen Methan;

beispielsweise würden in 50 ccm Kulturflüssigkeit nur 0,36 ccm Methan gelöst sein. Das Methan muß jedenfalls im Versuch durch die Oberfläche diffundieren, dabei wird aber die diffundierende Menge proportional der Berührungsfläche des Methans mit der Flüssigkeit, d. h. proportional der Oberfläche der Kulturflüssigkeit. Da durch die Größe der Gaszufuhr die Entwickelung der Bakterien bedingt ist, folgt aus dem Gesagten, daß die Oberfläche der Kulturflüssigkeit und nicht ihr Volumen das ausschlaggebende Moment bei der Beurteilung des Wachstums sein dürfte. Betrachten wir nun die obige Tabelle (S. 21) in diesem Sinne, indem wir anstatt der Volumina der Kulturflüssigkeiten die zugehörigen Oberflächen in die Spalten eintragen, so erhalten wir folgende Übersicht:

Verbrauch an Permanganat		Oberfläche	
1.	2.	1.	2.
10,4	8,8	78,4	60,4
8,3	8,7	46,6	46,6
6,3	6,1	41,4	34,8
7,6	14,6	28,8	50,2
5,7	4,9	51,4	41,4
4,0	4,7	43,4	45,4

Die vergleichende Betrachtung ergibt, daß die Übereinstimmung in den zugehörigen Werten sehr viel größer ist, als bei der

entsprechenden Übersicht, wo anstatt der Oberflächen die Volumina beachtet sind. Nimmt man die 1-Werte als die richtigen an, so wären die zu den 2-Werten berechneten theoretischen Mengen von Permanganat: 8,1; 8,3; 5,3; 13,4; 4,6; 4,4; die Übereinstimmung mit den durch Titration gefundenen Werten: 8,8; 8,7; 6,1; 14,6; 4,9; 4,7 ist also in leidlich zufriedenstellender Weise erreicht worden. So auf Erfahrung und Theorie gestützt, nahm ich die Oberflächen der Kulturflüssigkeiten als maßgebenden Faktor an und berücksichtigte ihn bei der Zeichnung der Kurvenbilder in entsprechender Weise. Die Kreisflächen der zylindrischen Schälchen wurden durch Ausmessen des Durchmessers unter Zuhilfenahme der Formel für die Kreisfläche festgestellt. Aus den beiden Flächenwerten zweier zugehöriger Versuche und ebenso den beiden Permanganatmengen wurde das Mittel genommen und durch einfache Proportion auf gleiche Fläche berechnet. Nun würde es allerdings theoretisch nicht genügen, wenn nur die Flächen bei den Versuchen gleich genommen würden, bezw. auf dieselbe Oberfläche umgerechnet würde; es wäre möglich, daß die Menge der Mineralsalze eine Rolle spielte, wobei, die Oberflächen der Gefäße als gleich vorausgesetzt, eine Kultur mit kleinerem Volumen im Nachteil sein würde gegen eine solche mit größerem Volumen. Abgesehen davon, daß in den von mir meist angewendeten Versuchszeiten von zwei oder vier Tagen Dauer eine Erschöpfung kaum auftreten dürfte, wurde diesem Umstande noch in der Weise Rechnung getragen, daß die eingegossenen Flüssigkeitsschichten gleich hoch genommen wurden, so daß die Volumina proportional den Oberflächen ausfielen.

Nährlösung.

Die meist benutzte anorganische Nährlösung nach Kaserer mit 0,1 % NH_4Cl, 0,05 % K_2HPO_4 und 0,02 % $MgSO_4 + 7H_2O$ ergab gutes Wachstum. Um einen Überblick über die Bedürfnisse der Methanbakterien zu gewinnen, mußten aber auch andere Mischungen erprobt werden. Vor allem wurde die Form, in der der Stickstoff gegeben wurde, abgewandelt. Außer Ammonchlorid und Ammoniummagnesiumphosphat kamen noch andere Ammonsalze zur Anwendung, ferner Nitrate und Nitrite. Daneben wurde auch die Reaktion der Lösung durch Beigabe der verschiedenen Phosphate des Kaliums gewechselt.

Folgende Nährlösungen wurden ausprobiert und nach der Kultur der Bakterien titriert:

1.	2.	3.
KNO_3 = 0,1 %	KNO_2 = 0,1 %	$(NH_4)_2SO_4$ = 0,1 %
$MgSO_4$ = 0,02 %	$MgSO_4$ = 0,02 %	$MgSO_4$ = 0,02 %
K_2HPO_4 = 0,05 %	K_2HPO_4 = 0,05 %	K_2HPO_4 = 0,05 %

4.	5.	6.
$(NH_4)_3PO_4$ = 0,1 %	$(NH_4)_2CO_3$ = 0,1 %	$(NH_4)(CNS)$ = 0,1 %
$MgSO_4$ = 0,02 %	$MgSO_4$ = 0,02 %	$MgSO_4$ = 0,02 %
K_2HPO_4 = 0,05 %	K_2HPO_4 = 0,05 %	K_2HPO_4 = 0,05 %

7.	8.	9.
NH_4Cl = 0,1 %	NH_4Cl = 0,1 %	NH_4Cl = 0,1 %
KH_2PO_4 = 0,05 %	K_2HPO_4 = 0,05 %	K_3PO_4 = 0,05 %
$MgSO_4$ = 0,02 %	$MgSO_4$ = 0,02 %	$MgSO_4$ = 0,02 %

Maßgebend sind bei

1 bis 6: verschiedene Stickstoffquellen (Nitrat, Nitrit, Ammonsalz);

7 bis 9: verschiedene Phosphate (mono-, di-, triphosphat des Kaliums).

Eisen wurde nicht besonders zugesetzt, da ich keinen Unterschied im Wachstum dadurch erzielen konnte. Von jedem Versuch wurden vier Kulturen angesetzt und hierauf nach einer Versuchsdauer von fünf Tagen bei 34° Celsius in einer Atmosphäre von ein Drittel Methan und zwei Drittel Luft mit Kaliumpermanganat titriert mit Ausnahme von Versuch zwei und Versuch sechs, die beide von vornherein reduzierende Substanzen enthielten [KNO_2 und $(NH_4)(CNS)$]. Die Nummern der Versuche in der Übersicht (Seite 25) stimmen mit den Nummern der Nährsalzlösungen überein. Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß sowohl Nitrat als Ammonsalze als Stickstoffquellen dienen können, und zwar erreicht man durch Kaliumnitrat und Ammoniumchlorid das beste Wachstum. Nitrit kann nicht verwertet werden. Mit allen von mir verwendeten Ammoniumsalzen erhielt ich Wachstum; etwas weniger gut als Ammoniumchlorid ging Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat und Ammoniumcarbonat. Von den Kaliumphosphaten ist das primäre KH_2PO_4 nicht zu verwerten; ich erzielte damit gar kein Wachstum. Seine Schädlichkeit beruht wohl auf seinen sauren Eigenschaften, die für Bakterien nicht zuträglich sind. Das sekundäre Salz K_2HPO_4 wie das tertiäre K_3PO_4 ergeben beide gute Resultate.

Übersicht der Ernten bei verschiedenen Nährlösungen.

Stoffe	Nr.	Flächen qcm	Mittel der Flächen	Permanganatverbrauch ccm	Mittel der Permanganatmengen	Aufgleiche Fläche berechnet (50)
KNO_3	1 a	17,4	17,4	6,9	7,1	20,6
	1 b	17,4		7,3		
KNO_2	2 a	17,4	17,4	—	—	—
	2 b	17,4		—		
$(NH_4)_2SO_4$	3 a	17,4	17,4	3,7	3,8	10,9
	3 b	17,4		3,9		
$(NH_4)_3PO_4$	4 a	25,5	25,5	7,2	7,0	13,7
	4 b	25,5		6,8		
$(NH_4)_2CO_3$	5 a	25,5	25,5	4,5	4,6	9,0
	5 b	25,5		4,7		
$(NH_4)(CNS)$	6 a	43,0	44,8	—	—	—
	6 b	46,6		—		
KH_2PO_4	7 a	25,5	25,5	—	—	—
	7 b	25,5		—		
K_2HPO_4	8 a	24,6	35,6	10,7	14,9	19,5
	8 b	46,6		19,1		
K_3PO_4	9 a	25,5	25,5	6,9	6,75	13,2
	9 b	25,5		6,6		

Da KNO_3 und NH_4Cl sehr gutes Wachstum ermöglichen, verwertete ich sie zur Erprobung der geeigneten Konzentration der Stickstoffquelle und des Kaliums.

Die Konzentrationsversuche begann ich mit der Verdünnung der „normalen Lösung“ ($NH_4Cl = 0{,}1\ \%$, $K_2HPO_4 = 0{,}05\ \%$, $MgSO_4 = 0{,}02\ \%$) auf die Bruchteile $^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_6$, $^1/_8$, $^1/_{10}$. Schon bei den letzten drei Stufen zeigte sich eine merkliche Schwächung des Wachstums. Als nächste Versuchsreihe stufte ich das Ammoniumchlorid von 2 % bis 0,001 % ab. In ähnlicher Weise

wurde das Kaliumnitrat behandelt; als Salze wurden hier verwendet $MgCl_2$ = 0,05 %, K_2SO_4 = 0,05 %, K_2HPO_4 = 0,05 % und bestimmte Mengen von KNO_3, von 2 % bis 0,00025 %, zugesetzt. Kaliummangel konnte also dabei nicht eintreten und daher keinen Einfluß auf das Wachstum ausüben, da ja noch andere Kaliumquellen vorhanden waren. Die Abstufung des Kaliums nahm ich in einer dritten Versuchsreihe vor. Zu diesem Zweck wurde als konstante Lösung angenommen: NH_4Cl = 0,1 %, $MgSO_4$ = 0,02 %, $(NH_4)_3PO_4$ = 0,05 % und verschiedene Mengen von K_2HPO_4 zugesetzt; Phosphatmangel konnte also nicht eintreten. Die drei letzten Versuchsreihen wurden mit je drei Kulturen für jede Konzentrationsstufe ausgeführt. Eine Titration der Stoffwechselprodukte erfolgte nicht, da es sich mehr um Orientierungsversuche als um genaue Feststellung der Mindestmengen und Höchstmengen der Nährstoffe handelte. Die Versuche mußten mit besonders reinen Salzen ausgeführt werden, und außerdem war eine sorgfältige Reinigung der dazu verwendeten Gefäße nötig, die aus Hartglas bestanden. Die Kulturen wurden fünf Tage bei 34° Celsius in einem Gasgemisch von ein Drittel Methan und zwei Drittel Luft gehalten.

Übersicht der Abstufungsversuche für NH_4Cl und KNO_3.

1. Abstufung des Ammoniumchlorids.	Wachstum	2. Abstufung des Nitrats.	Wachstum
2 % NH_4Cl	gar nicht	2,0 % KNO_3	gar nicht
1,0		1,0	
0,8		0,5	mäßig
0,5	mäßig	0,2	sehr gut
0,3	sehr gut	0,1	
0,1		0,05	
0,05		0,025	
0,025		0,005	
0,005		0,0025	
0,0025		0,0005	
0,0005		0,00025	
0,00025		0,0001	
0,0001	mäßig	0	gar nicht
0	gar nicht		

Es geht aus dieser Zusammenstellung hervor, daß die Bakterien mit wenig Stickstoff noch auszukommen vermögen,

daß sie aber ohne Stickstoff, was vorauszusehen war, nicht wachsen. Die Maximalkonzentration liegt zwischen 0,5 und 0,8 % NH_4Cl und zwischen 0,5 und 1 % KNO_3.

3. Abstufung des Kaliums.

	Wachstum
2,0 % K_2HPO_4	sehr schwach
1,0	gut
0,8	gut
0,5	sehr gut
0,3	sehr gut
0,1	sehr gut
0,025	mäßig
0,005	schwach
0,0025	schwach
0,0005	schwach
0,00025	sehr schwach
0	gar nicht

Die Maximalkonzentration für Kaliumphosphat liegt etwa bei 2 % K_2HPO_4; offenbar wird ein zuviel an Kalium eher ertragen, während sich ein Mangel schneller bemerkbar macht als beim Stickstoff. So ist schon bei 0,005 % K_2HPO_4 das Wachstum recht schwach. Das verhältnismäßig hohe Optimum für Kalium ist etwas auffällig, doch ist dieses nicht der einzige Fall, der bisher festgestellt ist: z. B. fand Maertens (12) ähnliches im hiesigen Institut bei Blaualgen.

Um mit völliger Sicherheit das autotrophe Wachstum der Methanbakterien festzustellen, wendete ich besondere Vorsichtsmaßregeln an. Ich benutzte dazu ganz besonders reine Salze und destillierte das käufliche „destillierte" Wasser noch einmal. Die Kulturkölbchen, die ich verwendete, reinigte ich mit Chromschwefelsäure und spülte sie zehn Mal mit Leitungswasser und zwei Mal mit destilliertem Wasser aus. Als Verschluß dienten nicht Wattepfropfen sondern Glaskappen, weil ich das Herabfallen von Watteteilchen vermeiden wollte. Da ich bei dieser Versuchsanordnung Bakterienwachstum erzielte, ist der Nachweis für die Autotrophie der Methanbakterien erbracht.

Gasgemisch.

Bei dieser Gruppe von Versuchen galt es ganz besonders, möglichst alle maßgebenden Faktoren zu beachten, weil diese Untersuchungen noch wichtiger erscheinen als die Abstufungen in der Zusammensetzung der Nährlösungen. Da die Versuche zum Teil gleichzeitig ausgeführt wurden, war es dringend notwendig, irgendwelche ungewollten Differenzen in den verschiedenen verwendeten Hilfsmitteln zu vermeiden. Das Volumen der einzelnen Gasglocken war im wesentlichen dasselbe; ferner war die Zahl der unter diese Glocken gebrachten Kulturen die gleiche, oder, falls ungleich große Kulturschälchen verwendet wurden, wurde gleiche Oberfläche mit Annäherung hergestellt. Jede Glocke erhielt die nämliche Zahl von Gasfüllungen und wurde die gleiche Zeit von zweimal bezw. viermal 24 Stunden in Entwickelung belassen. Die Hälfte der Kulturen unter einer Glocke wurde nach 2 Tagen herausgenommen und die übrige Hälfte nach neuer Füllung mit dem Gasgemisch weitere 2 Tage im Thermostaten gelassen, so daß auch in dieser Beziehung eine möglichst große Vergleichbarkeit erreicht wurde. Die Temperatur der drei von mir verwendeten Thermostaten schwankte, sowohl was die Temperaturen der einzelnen Thermostaten in verschiedenen Zeiten als auch der verschiedenen Thermostaten untereinander anbelangt, innerhalb so geringer Grenzen, daß ein merkbarer Einfluß auf die Versuche nicht vorhanden sein konnte. Als Gasmischungen wurden Methan und Luft in verschiedenen Prozenten verwendet und ebenso Methan und Sauerstoff. Nimmt man dazu die verschiedene Entwickelungszeit von 2 und 4 Tagen, so ergeben sich 4 Versuchsreihen. In der Methan-Luft-Versuchsreihe untersuchte ich Abstufungen, von 10 % zu 10 % fortschreitend, von 0 % bis 100 % Methan und dem entsprechenden Rest Luft; in der Methan-Sauerstoff-Reihe begnügte ich mich mit weniger Stufen. Bei der Methan-Luft-Reihe führte ich die gewünschte Gas-Mischung herbei durch Auspumpen der Luft auf die gewünschte Verdünnung, die dem beabsichtigten Luftgehalt entsprach, und Auffüllen des Vakuums mit Methan. Die Methan-Sauerstoff-Reihe erforderte ein umständlicheres Verfahren. Hierbei wurde zwei Mal bis auf einen Rest von 15 % Luft ausgepumpt und mit Sauerstoff, der von einer Bombe auf ein Gasometer abgefüllt worden war, nachgefüllt. Dadurch wurde das

Volumen des Stickstoffs schließlich auf etwa 0,0144 Volumen der Gesamtgasmenge herabgedrückt. Nun wurde nochmals ausgepumpt bis auf den Sauerstoffrest, der im Gasgemisch enthalten sein sollte, wodurch der Stickstoffgehalt sich abermals verringerte, und die Verdünnung durch Nachfüllen von Methan wieder auf Atmosphärendruck gebracht. Die Verdünnungen wurden an einem U-förmigen Quecksilbermanometer abgelesen. Zur Kontrolle wurde auch ein Versuch mit 100 % Methan und 0 % Sauerstoff angesetzt und ein solcher mit 100 % Sauerstoff und 0 % Methan. Um die letzten Spuren des Sauerstoffs zu entfernen, ging ich auf chemischem Wege vor. Es wurden hierzu nicht die gewöhnlichen Gasglocken verwendet sondern ein Vakuum-Exsikkator mit Glashahn. Die Sauerstoffabsorption wurde durch alkalische Pyrogallollösung, die im Verhältnis von 0,25 Gramm Pyrogallol zu 10 ccm Kalilauge vom spez. Gewicht 1,05 angewendet wurde, erreicht. Zunächst brachte ich auf den Boden des Exsikkators das Pyrogallol und legte darüber eine auf Klötzchen ruhende Glasplatte an (Fig. 5), um zu vermeiden, daß die auf dem Boden befindliche Lösung die Kulturgefäße verunreinigte. Auf diese Platte wurden nun die geimpften Kulturen gestellt. An dem kurzen inneren Ansatzstück des Glasstöpsels des Exsikkators brachte ich ein Glasrohr an, das in winkeliger Biegung nach dem Boden verlief. Dann wurde zwei Mal bis auf einen Rest von 4 % Luft ausgepumpt und jedes Mal mit Methan nachgefüllt. Um die in einem Nebengefäß befindliche Kalilauge in den Exsikkator hineinzubringen, pumpte ich nochmals etwa 5 % des Volumens aus und senkte das Schenkelrohr nach Schließen des daran befindlichen Hahnes in die Kalilauge bis fast auf den Boden des Nebengefäßes ein. Mit größter Vorsicht öffnete ich dann den Hahn wieder, so daß die Kalilauge ganz langsam durch das innere Rohr hindurch in die Glocke floß und das auf dem Boden befindliche Pyrogallol löste. Die entstandene Lösung zeigte infolge der kleinen Sauerstoffreste der Luft nur eine geringe Bräunung, so daß sicher sehr bald aller Sauerstoff absorbiert war. Der Versuch mit 100 % Sauerstoff und 0 % Methan erforderte nur genügendes (zweimaliges) Auspumpen der Luft und Nachfüllen mit Sauerstoff.

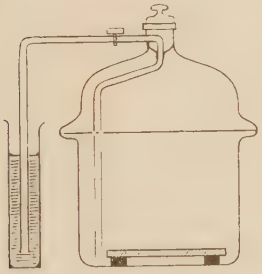


Fig. 5

Die Ergebnisse der Versuche sind in den folgenden Zahlenübersichten und Kurvenbildern zusammengestellt. Die Volumina der Kulturflüssigkeiten, die titriert wurden, sind in den Übersichten ganz fortgelassen, da ich sie nur anfänglich mit berücksichtigte, nachher aber als bedeutungslos nicht mehr beachtete. Für alle Gasgemischversuche wurde die normale Nährlösung ($NH_4Cl = 0{,}1\ ^0/_0$, $K_2HPO_4 = 0{,}05\ ^0/_0$, $MgSO_4 = 0{,}02\ ^0/_0$) verwendet.

Übersicht der Gasgemisch-Versuche.

Methan-Sauerstoff; 2 Tage bei 34°.

Methan %	Sauerstoff %	Gasfüllungen	Kulturdauer von	Kulturdauer bis	Zahl der Tage	Verbrauch an Permanganat a	Verbrauch an Permanganat b	Oberfläche a	Oberfläche b	Mittelwerte Permanganat	Mittelwerte Oberflächen	Au gleic Obe fläc
10	90	1	6. Nov.	8. Nov.	2	3,0	2,7	45,4	46,6	2,85	46,0	3,
20	80	1	6. „	8. „	2	2,1	3,7	24,6	44,2	2,9	34,4	4,
30	70	1	10. „	12. „	2	4,8	3,2	42,7	25,6	4,0	34,15	5,
90	10	1	10. „	12. „	2	8,0	8,2	44,2	44,2	8,1	44,2	9,
98	2	1	30. „	2. Dez.	2	9,5	5,0	46,6	23,8	7,25	35,2	10,
100	0	1	13. „	15. Nov.	2	0	0	18,6	42,0	0	30,3	0

Methan-Sauerstoff; 4 Tage bei 34°.

Methan %	Sauerstoff %	Gasfüllungen	Kulturdauer von	Kulturdauer bis	Zahl der Tage	Verbrauch an Permanganat a	Verbrauch an Permanganat b	Oberfläche a	Oberfläche b	Mittelwerte Permanganat	Mittelwerte Oberflächen	Au gleic Obe fläc
10	90	2	6. Nov.	10. Nov.	4	6,5	6,0	45,4	42,7	6,25	44,05	7,
20	80	2	6. „	10. „	4	7,1	7,2	45,4	45,4	7,15	45,4	7,
30	70	2	10. „	14. „	4	7,7	4,1	46,6	25,6	5,9	36,1	8,
90	19	2	10. „	14. „	4	9,4	8,9	23,8	23,8	9,15	23,8	19,
98	2	2	30. „	4. Dez.	4	23,9	21,5	44,2	35,3	22,7	39,75	29,
100	0	2	13. „	17. Nov.	4	0	0	44,2	25,6	0	34,9	0

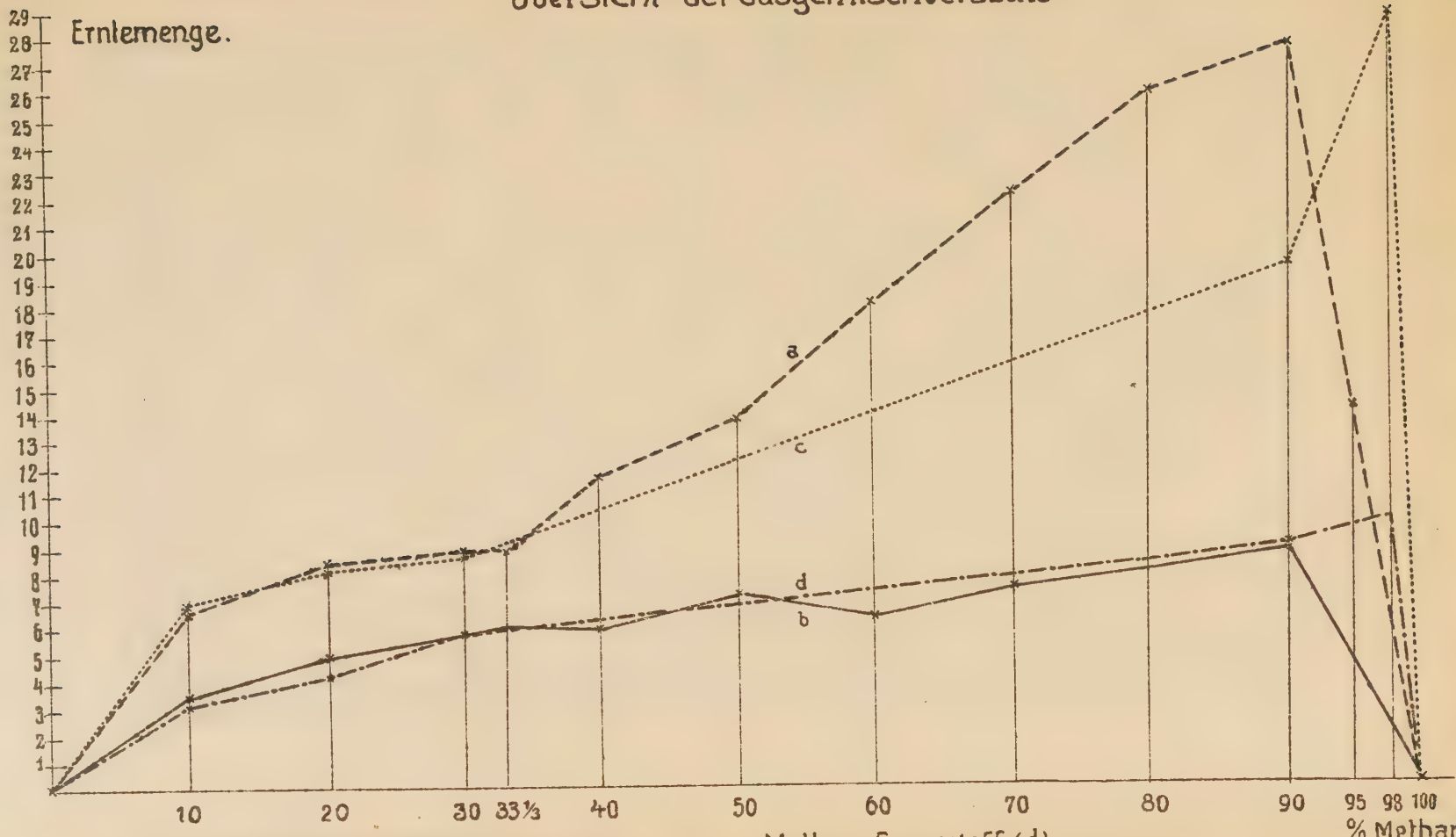
Methan-Luft; 2 Tage bei 34°.

Methan %	Luft %	Zahl der Gasfüllungen	Kulturdauer von	Kulturdauer bis	Zahl der Tage	Verbrauch an Permanganat a	Verbrauch an Permanganat b	Mittel der Permanganatmengen	Oberfläche a	Oberfläche b	Mittel der Oberflächen	Auf gleiche Oberfläche berechnete Permanganatmenge
0	100	1	4. Okt.	6. Okt.	2	0	0	0	46,6	41,4	44,0	**0**
10	90	1	8. „	10. „	2	1,4	3,0	2,2	17,5	46,5	32,0	**3,4**
20	80	1	8. „	10. „	2	4,0	4,7	4,35	43,4	45,4	44,2	**4,9**
30	70	1	8. „	10. „	2	4,6	5,6	5,1	41,4	45,4	43,4	**5,9**
40	60	1	12. „	14. „	2	10,4	6,4	8,4	85,2	52,2	68,8	**6,1**
50	50	1	12. „	14. „	2	6,9	6,1	6,5	42,0	46,6	44,3	**7,3**
60	40	1	12. „	14. „	2	8,4	5,6	7,0	64,0	46,6	55,3	**6,3**
70	30	1	16. „	18. „	2	8,4	9,2	8,9	61,3	58,9	60,1	**7,6**
80	20	1	16. „	18. „	2	6,7	7,4	7,1	41,4	46,5	44,0	**8,1**
90	10	1	16. „	18. „	2	10,2	7,8	9,0	61,6	39,7	50,7	**8,9**
100	0	1	18. „	20. „	2	0	0	0	62,2	34,8	48,5	**0**
$33^1/_3$	$66^2/_3$	1	31. „	2. Nov.	2	5,7	4,9	5,8	51,4	41,4	46,4	**6,2**

Methan-Luft; 4 Tage bei 34°.

Methan %	Luft %	Zahl der Gasfüllungen	Kulturdauer von	Kulturdauer bis	Zahl der Tage	Verbrauch an Permanganat a	Verbrauch an Permanganat b	Mittel der Permanganatmengen	Oberfläche a	Oberfläche b	Mittel der Oberflächen	Auf gleiche Oberfläche berechnete Permanganatmenge
0	100	2	4. Okt.	8. Okt.	4	0	0	0	46,6	41,4	44,0	**0**
10	90	2	8. „	12. „	4	10,4	8,8	9,6	60,4	50,8	55,6	**6,9**
20	80	2	8. „	12. „	4	6,3	6,1	6,2	41,4	34,8	38,1	**8,1**
30	70	2	8. „	12. „	4	8,2	7,2	7,7	45,4	41,4	43,4	**8,9**
40	60	2	12. „	16. „	4	10,9	8,9	9,9	48,0	38,8	43,4	**11,4**
50	50	2	12. „	16. „	4	14,6	7,6	10,6	50,2	28,9	39,5	**13,4**
60	40	2	12. „	16. „	4	21,3	23,9	22,8	62,2	62,6	62,4	**18.1**
70	30	2	16. „	20. „	4	23,8	20,2	22,0	54,4	49,6	52,0	**22,2**
80	20	2	16. „	20. „	4	18,1	21,5	19,8	34,8	41,4	38,1	**26,0**
90	10	2	16. „	20. „	4	26,0	25,1	25,55	46,6	45,4	46,0	**27,7**
95	5	2	18. „	22. „	4	12,2	12,0	12,1	46,6	46,6	46,6	**13,0**
$33^1/_3$	$66^2/_3$	2	31. „	4. Nov.	4	8,3	8,7	8,5	46,6	46,6	46,6	**9,1**
100	0	2	18. „	22. Okt.	4	0	0	0	62,2	41,4	51,8	**0**

Übersicht der Gasgemischversuche



In der graphischen Darstellung, Fig. 6, bedeutet:

a	Die Versuchsreihe mit			Methan-Luft			in der Zeit von	4 Tagen
b	„	„	„	Methan-Luft	„	„	„ „ 2	„
c	„	„	„	Methan-Sauerstoff	„	„	„ „ 4	„
d	„	„	„	Methan-Sauerstoff	„	„	„ „ 2	„

Alle vier Linienzüge steigen von 0 % Methan zunächst an; schon bei 10 % Methan ist in allen vier Fällen ein deutliches Wachstum zu erkennen. Abgesehen von kleinen Abweichungen nehmen die vier Kurven einen einheitlichen Verlauf, indem sie bis zu einem Höchstwert ansteigen, der zwischen 90 % und 100 % Methan liegt. Nachdem dieser Kardinalpunkt erreicht ist, erfolgt ein Absteigen der Linienzüge, bis bei 100 % Methan der Wert o wieder erreicht ist, da infolge des Fehlens von Sauerstoff hierbei kein Wachstum mehr auftritt, und infolgedessen keine organischen Substanzen in die anfänglich anorganische Lösung gelangen. Das Maximum der gebildeten organischen Stoffe wird etwa bei 90 % Methan und 10 % Luft bzw. bei 98 % Methan und 2 % Sauerstoff erreicht, so daß also in diesem Fall viel Methan und sehr wenig Sauerstoff vorhanden ist; das Abfallen der Kurve auf o erfolgt also sehr rasch. Weitere Ergebnisse erhält man, wenn man zunächst die beiden Linienzüge a und b miteinander vergleicht, die der ersten Gruppe von Versuchen entsprechen, den Untersuchungen über den Einfluß der verschiedenen Methan-Luftgemische auf das Wachstum. Es ergibt sich aus diesem Vergleich, daß die durch den Zeitfaktor (Versuchszeit von zwei und vier Tagen) bedingten Unterschiede ziemlich erheblich sind. Die Kurve a steigt zu bedeutend höheren Werten an als die Kurve b und verläuft daher viel steiler als diese. In den unteren Konzentrationen, etwa bei 10 % Methan bis 30 % Methan, sind keine erheblichen Unterschiede im Verlaufe der Kurven vorhanden, obwohl beide unter sich infolge des Zeitfaktors um ein Merkbares von einander abweichen. Bei den höheren Stufen des Methans (etwa 60 % bis 90 % Methan) ist die Abweichung der Linienzüge bedeutend größer, da die Kurve für die Zeit von vier Tagen (a) nun schneller ansteigt als die für zwei Tage (b), die ja nur etwa ein Drittel des Maximums der Kurve a erreicht. Diese Tatsache, daß die Kurve b ziemlich schwach ansteigt bei zunehmendem Methangehalt bzw. abnehmendem Sauerstoffgehalt, erklärt sich wohl daraus, daß in der kürzeren Zeit kein so er-

heblicher Einfluß durch die Unterschiede in den Gasgemischen — bzw. Nährstoffkonzentrationen, da ja das Methan nicht nur Energiequelle, sondern auch Nahrungsmittel ist — ausgeübt werden kann.

Ähnliche Schlüsse gestattet der Vergleich der Linienzüge c und d, die die Ernten in zwei und vier Tagen bei verschiedenen Methan-Sauerstoffgemischen angeben. Auch hier steigt die Kurve für vier Tage (c) steiler an als die für zwei Tage (d) und erreicht ein höher liegendes Maximum als diese. Auch hier liegen die Höchsternten bei sehr hohem Methan- und sehr niedrigem Sauerstoffgehalt, bei etwa 98 % Methan und 2 % Sauerstoff. In ähnlicher Weise wie oben ist der Verlauf der Kurve für zwei Tage (d) verhältnismäßig flach.

Eine andere Möglichkeit des Vergleichens besteht darin, daß man in der graphischen Darstellung die Kurvenbilder a und c und ebenso b und d gegeneinander hält, also nicht die Methan-Sauerstoffversuche untereinander vergleicht und die Methan-Luftversuche untereinander, sondern die Versuche von gleicher Zeitdauer. Es zeigt sich, daß die Linienzüge a und c beträchtlich von einander abweichen. Die „Luftkurve“ (a) ist bedingt durch Ansteigen der Methanmenge und Abnahme der Sauerstoffmenge. Beide bewirken Zunahme der Ernte bis dahin, wo zu wenig Sauerstoff zugegen ist und daher die Methansteigerung nichts mehr ausmacht. Die „Sauerstoffkurve“ steigt in derselben Weise. Nur nimmt die Sauerstoffmenge nach rechts weniger ab; daher erfolgt ein geringeres Ansteigen, bis endlich (jenseits 10 % Sauerstoff) man sich dem Optimum nähert, weshalb nun steiles Ansteigen vorhanden ist, das bei 2 % Sauerstoff, ebenso wie bei 10 % Luft — die ebenfalls 2 % Sauerstoff enthalten — den steilen Gipfel erreicht. Auffallend ist das zweimalige steile Ansteigen, nämlich ganz im Anfang und dann vor Erreichung des Optimums. Es beruht darauf, daß zwei Faktoren ständig variiert wurden, nämlich der Methan- und der Sauerstoffgehalt. Der erste kräftige Anstieg ist bedingt durch die Zunahme der Methankonzentration von 0 % bis etwa 10 %. Eine weitere entsprechende Förderung durch Vermehrung der Methantension wird durch den noch zu hohen Sauerstoffdruck zunächst verhindert. Weiterhin aber erreicht dieser schließlich die niedrigen Werte, an die die Methanbakterien angepaßt sind. Die Folge ist die ungehemmte Steigerung des Wachstums durch Annäherung beider variierten Faktoren an das

Optimum. Die abweichende Form der Sauerstoffkurve gegenüber der für Luft erklärt sich aus der hier enger zusammengedrängten Änderung der Sauerstofftension, bei der eine gleiche Änderung ein größeres Stück der Kurve umfaßt. Denkt man sich die Sauerstoffkurve so in das Koordinatensystem eingetragen, daß die Sauerstoffprozente mit denen der Luftkurve zusammenfallen, so sind die beiden Kurven von 50 % Methan ab nahezu identisch, nur daß der höheren Methanmenge eine etwas höhere Ernte entspricht. Die Kurven für zwei Tage, b und d, entsprechen dem vollkommen und zeigen genau dieselben Verhältnisse; nur daß bei 90 % Methan Kurve b nicht höher ansteigt als Kurve d. Bei kurzer Versuchszeit sind also die Ergebnisse nicht wesentlich von einander verschieden; erst bei größerer Versuchsdauer vermögen demnach die bestimmenden Faktoren genügend einzuwirken und demgemäß erheblichere Ernteunterschiede hervorzubringen.

Da bei 90 % Methan mit 10 % Luft besseres Wachstum erzielt werden konnte als bei 90 % Methan mit 10 % Sauerstoff und ebenso bei 98 % Methan und 2 % Sauerstoff besseres Wachstum als bei 90 % Methan mit 10 % Sauerstoff, muß festgestellt werden, daß die Methanbakterien am besten bei einem verhältnismäßig geringen Sauerstoffdruck gedeihen. Die Menge des vorhandenen Methans darf möglichst groß sein, das ergibt sich daraus, daß in allen vier Kurven selbst bei sehr hohen Methankonzentrationen keine Schädigung eintrat; das ist ja, da es sich um methanzehrende Bakterien handelt und auch sonst Methan kaum Giftwirkung ausübt, auch nicht erstaunlich. Daß bei 95 % Methan und 5 % Luft die Ernten geringer sind als bei 90 % Methan und 10 % Luft, liegt offenbar daran, daß sich der Sauerstoffmangel bemerkbar zu machen beginnt.

Einige Beachtung verdient die Tatsache, daß der Einfluß zu reichlicher Sauerstoffmenge in den hohen Stufen des Methangehaltes bedeutender ist als in den niedrigen: daß die Methan-Luft-Kurve für die Zeit von vier Tagen (a) zum Beispiel etwa bei 90 % Methan stärker von der Methan-Sauerstoff-Kurve (c) abweicht als in den niedrigen Methanprozenten; man könnte denken, daß der hemmende Einfluß zu reichlicher Sauerstoffmenge bei den hohen Ernten eigentlich geringer sein müsse, sich weniger bemerkbar machen könne, als bei schwachem Wachstum, da ja ein stark fördernder Faktor, hoher Methangehalt, vorhanden ist,

während zu dem ohnehin spärlicherem Gedeihen bei niederen Methanmengen ja noch ein hemmender Faktor, hoher Sauerstoffgehalt, hinzutritt, also eine Vermehrung der Hemmungen und infolgedessen umso geringeres Wachstum herbeiführen müsse. Offenbar liegt jedoch der Sachverhalt anders: Um optimales Gedeihen zu ermöglichen, müssen alle Bedingungen möglichst günstig sein. Jede Störung verursacht hier schon ein beträchtliches Sinken der Vermehrungsgröße.

Alle Versuche mit diesen Gasgemischen wurden bei einem Gasdruck von 1 Atmosphäre ausgeführt. Höhere Drucke verwendete ich nicht, da hierzu die benutzten Gasglocken nicht zu gebrauchen gewesen wären, und da eine Beschränkung der Versuche aus mehreren Gründen am Platze war. Das wichtigste Ergebnis außer Maximum und Minimum der Gaskonzentrationen ist die Tatsache, daß die von mir untersuchten Methanbakterien bei Anwesenheit von Methan als Kohlenstoffquelle aërob, aber an niedere Sauerstoffdrucke angepaßt, also mikroaërophil sind.

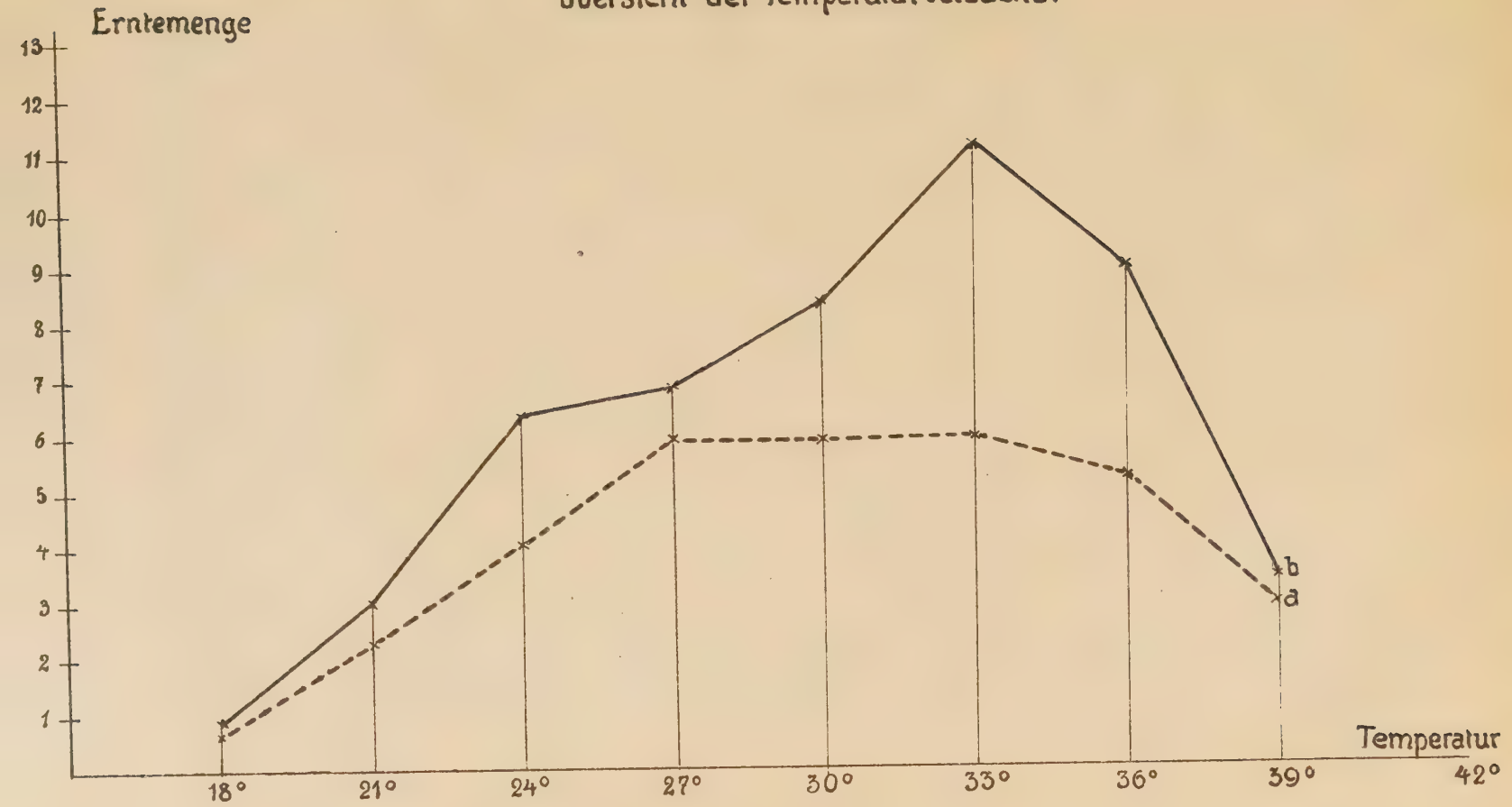
Daß die Lage der Kardinalpunkte nicht nur vom Sauerstoffdruck abhängt, wurde durch einen Versuch erhärtet, bei dem geringer Sauerstoffgehalt und nur mittelmäßiger Methangehalt gewählt wurden; das war dadurch möglich, daß der Rest des Vakuums mit einem neutralen Gas aufgefüllt wurde, nämlich mit Wasserstoff, der sich nach besonderen Untersuchungen als für die Ernährung unbrauchbar erwies. Das Gasgemisch hatte die Zusammensetzung: 40 % Methan, 2 % Sauerstoff, 58 % Wasserstoff. Wäre die Methanmenge nur von untergeordneter oder gar keiner Bedeutung, so hätte die Ernteziffer, entsprechend den Versuchen mit 2 % Sauerstoff (die aber 90 % bezw. 98 % Methan enthielten) etwa 28 ccm Permanganat betragen müssen; anstatt dessen erhielt ich aber für vier Tage nur die Werte 16,7 und 17,8, während ich bei 2 % Sauerstoff und 90 % Methan 27,7 erhielt und bei 40 % Methan mit 12 % Sauerstoff (60 % Luft) 11,4. Weder Sauerstoff noch Methan sind also allein ausschlaggebend.

Temperatur.

Bisher wurden von mir bei der Kultur der Methanbakterien im Anschluß an Söhngen eine Temperatur von 34° Celsius benutzt. Daß jedoch auch andere Wärmegrade Wachstum ermöglichten

Fig. 1.

Übersicht der Temperaturversuche.



--------2 Tage (a) bei 40 % Methan u. 60 % Luft.

————— 4 Tage (b)

und zwar sowohl höhere als niedrigere, war durchaus denkbar; die beste Temperatur mußte systematisch ausprobiert werden. Zu diesem Zweck stand mir ein mit Hilfe eines Thermoregulators besonders genau einstellbarer Thermostat zur Verfügung.

Ich begann die Untersuchungen der Temperaturreihe mit 18° Celsius und ließ den Wärmeschrank in Gradabständen von 3° bis auf 41° gelangen. Da die genauere Einstellung des Thermostaten von einer Temperatur zur nächst höheren eine Zeit von mindestens zwei Tagen erforderte, nahmen diese Abstufungsversuche für den Wärmegrad eine nicht unbeträchtliche Zeitspanne in Anspruch.

Die Kurve, Fig. 7, zeigt, daß das Minimum kleiner ist als 18°; das Optimum liegt bei 33—34°, während das Maximum etwa 40° beträgt. Niedrigere Temperaturen als 18° wurden nicht untersucht; bei diesen Wärmegraden ist die Entwickelung, falls sie überhaupt stattfindet, nur äußerst langsam. Innerhalb der untersuchten Wachstumsspanne von 20° findet fast kontinuierlich an- und absteigende Entwickelung statt, die in der Umgebung von 33° ihre größte Höhe erreicht. Die bis zu diesem Punkt ansteigenden Entwickelungslinien fallen von hier aus etwas steiler als sie aufwärts liefen, nach der Temperaturachse ab. Der Zeitfaktor äußert sich ähnlich wie bei den Kurven für die Gasgemischversuche: die Kurve für die Zeit von vier Tagen (a) steigt höher an als die für eine Entwicklungszeit von zwei Tagen (b), die flacher verläuft und somit eine weniger starke Erntezunahme bei den verschiedenen Wärmegraden ausdrückt. Einige Unebenheiten finden sich auch in diesen beiden Linienzügen; so scheinen die Ordinaten für 27° und 30° in der Kurve a etwas zu niedrig ausgefallen zu sein; die Ordinate für 30° in der Kurve b ist wohl ebenfalls etwas zu klein. Da für das Wachstum o beide Kurvenpunkte, der für a und der für b, zusammenfallen müssen, öffnet sich die Fläche zwischen den beiden Linien nach dem Maximum der Erntemenge, den Höhepunkten der beiden Kurven hin und schließt sich, von links nach rechts fortschreitend, bei etwa 39°, wo das Wachstum wiederum eingestellt wird. Die Temperaturversuche wurden nur mit einem Gasgemisch von 40% Methan und 60% Luft ausgeführt, da andere Konzentrationen keinen grundsätzlichen Unterschied im Entwickelungsverlauf geben könnten, sondern nur quantitativ verschieden ausfallen würden.

Übersicht der Temperaturversuche.

40% Methan; 60% Luft; 2 Tage.

Temperatur	Gasfüllungen	Kulturzeit von	Kulturzeit bis	Zahl der Tage	Fläche a	Fläche b	Verbrauch an Permanganat a	Verbrauch an Permanganat b	Mittelwerte der Flächen	Mittelwerte der Permang.-Werte	Auf gleiche Oberfläche berechnete Permanganatmenge
18°	1	3. Okt.	5. Okt.	2	24,6	18,1	0,3	0,3	21,4	0,3	**0,7**
21°	1	9. „	11. „	2	46,6	45,4	2,2	2,0	46,0	2,1	**2,3**
24°	1	15. „	17. „	2	25,5	20,9	2,1	2,2	23,2	2,2	**4,1**
27°	1	22. „	24. „	2	44,2	33,3	5,3	3,9	38,7	4,7	**6,1**
30°	1	28. „	30. „	2	45,4	23,8	5,5	2,7	34,6	4,1	**6,0**
33°	1	3. Nov.	5. Nov.	2	85,2	52,4	10,4	6,4	68,8	8,4	**6,1**
36°	1	10. „	12. „	2	45,4	33,3	2,3	1,9	39,4	4,2	**5,2**
39°	1	16. „	18. „	2	62,2	25,5	1,7	0,7	43,9	2,5	**2,9**

Übersicht der Temperaturversuche.

40 % Methan; 60 % Luft; 4 Tage.

Temperatur	Gasfüllungen	Kulturzeit von	Kulturzeit bis	Zahl der Tage	Fläche a	Fläche b	Verbrauch an Permanganat a	Verbrauch an Permanganat b	Mittelwerte der Flächen	Mittelwerte der Permang.-Werte	Auf gleiche Oberfläche berechnete Permanganatmenge
18°	2	3. Okt.	7. Okt.	4	46,6	46,6	0,7	0,9	46,6	0,8	**0,9**
21°	2	9. „	13. „	4	45,4	24,6	2,6	1,8	35,5	2,2	**3,1**
24°	2	15. „	19. „	4	24,5	20,9	3,0	2,8	22,7	2,9	**6,4**
27°	2	22. „	26. „	4	46,6	15,9	6,5	2,9	31,3	4,7	**7,0**
30°	2	28. „	1. Nov.	4	44,2	23,8	7,5	4,0	34,0	5,8	**8,5**
33°	2	3. Nov.	7. „	4	62,2	24,6	10,9	8,9	43,4	9,9	**11,4**
36°	2	10. „	14. „	4	18,1	25,5	3,7	4,5	21,8	4,1	**9,2**
39°	2	16. „	20. „	4	45,4	45,4	2,7	3,3	45,4	3,0	**3,4**

Licht, Zeit und andere Faktoren.

Um den Einfluß des Lichtes festzustellen, benutzte ich zur Kultur einen belichtbaren Thermostaten, dessen Tür aus einer Glasplatte bestand. Nachdem ich die belichteten Kulturen gleichen Bedingungen wie die verdunkelten ausgesetzt hatte, (34°, Gasmischung von $^1/_3$ Methan und $^2/_3$ Luft), ließ ich die Entwickelung etwa acht Tage vor sich gehen. Unterschiede in der Ernte konnte ich nicht feststellen; auch die Farbe der Bakterienhaut zeigte gar keine Änderung, so daß man ohne weiteres den Schluß ziehen kann, daß das Licht gar keinen Einfluß auf die Entwickelung der Methanbakterien ausübt. Die Methanabsorption ist also nicht, etwa wie die Kohlensäureassimilation der Pflanzen, an die Anwesenheit von Licht gebunden.

Bisher wurde fast nur von Kulturen gesprochen, deren Alter vier Tage beträgt. Diese Tatsache, daß eine so geringe Zeit genügt, um erhebliches Wachstum hervorzubringen, beweist die Lebhaftigkeit, mit der das Methan absorbiert wird. So verbrauchten 20 Kulturen, die ich zum Zweck dieser Feststellung unter eine Glocke in Methan-Luft-Atmosphäre brachte, in zwei Tagen (am zweiten und dritten Entwickelungstag) 102 ccm Gas; die absorbierende Oberfläche betrug in diesem Fall, da es sich um zylindrische Gefäße mit 4,8 cm Durchmesser handelte, rund 362 qcm. Eine andere Gruppe von 30 Kulturen mit dem Durchmesser 4,5 cm verbrauchte in derselben Entwickelungszeit von zwei Tagen 135 ccm Gas. Der Verbrauch wurde in beiden Fällen an der Menge des nachgesogenen Wassers gemessen; da es sich nur um die ungefähre Feststellung handelte, genügte diese Methode. Da innerhalb so kurzer Zeit starkes Wachstum erfolgt, ist es nicht erstaunlich, daß bei geeigneter Beleuchtung mit bloßem Auge schon nach 24 Stunden mit Sicherheit Wachstum festgestellt werden kann. Zu diesem Zweck beobachtet man die Oberfläche der Flüssigkeit am besten nicht von oben sondern von unten und zwar in der Weise, daß die Blickrichtung einen kleinen Winkel mit der Fläche bildet; am deutlichsten ist das Wachstum dann erkennbar, wenn die Beobachtungsrichtung ungefähr senkrecht zur Richtung des einfallenden Lichtes ist. Eine von Fremdkörpern völlig freie Wasserfläche unterscheidet sich deutlich von einer geimpften Fläche, die 24 Stunden in einer Methan-Luft-Atmosphäre gestanden hat: sie erscheint absolut klar und ohne Trübung.

Die gebildete Haut wird schon nach kurzer Zeit stärker: nach vier bis fünf Tagen sinkt sie zu Boden, und es bildet sich allmählich wieder eine neue Haut. Um die Zunahme des Wachstums nach einer bestimmten Reihe von Tagen quantitativ zu untersuchen, ging ich ähnlicher Weise vor wie bei den Versuchen mit verschiedenen Gasgemischen und Temperaturen. Ich kultivierte bei 34° in anorganischer Nährlösung verschiedene Zeiten hindurch bei $^1/_3$ Methan und $^2/_3$ Luft und stellte dann die Ernte fest. Der untersuchte Zeitraum beträgt 12 Tage. Alle zwei Tage wurde das Gesgemisch ereuert, damit infolge Mangels an Methan oder Sauerstoff nicht eine Hemmung des Wachstums eintreten konnte. Da die Versuchszeit ziemlich erheblich war gegenüber den bisherigen Untersuchungen, mußte darauf geachtet werden, daß die möglicherweise auftretende allmähliche Erschöpfung der Nährlösung gleichmäßig eintrat. Dieses erreichte ich, indem ich die Volumina bei verschieden großen Gefäßen proportinal der Oberfläche nahm, da diese ja die Größe der Gasabsorption bestimmt. Das konnte dadurch erreicht werden, daß in allen Schälchen eine gleich hohe Flüssigkeit eingegossen wurde, so daß nun vergleichbare Bedingungen hergestellt waren. Die folgende Übersicht (S. 42) gibt die gefundenen Zahlenwerte wieder. Die zugehörige graphische Darstellung (Fig. 8), ist auf Grund dieser mittelst Titration ausgeführten Messungen angefertigt.

Aus der graphischen Darstellung ist deutlich die Zunahme der gebildeten organischen Stoffe, und damit des Wachstums, je nach der Kulturzeit ersichtlich. Der Linienzug nimmt einen ziemlich regelmäßigen Verlauf; mit zunehmender Zeit wachsen die Erntemengen. Daß eine Stauung der Entwicklung auf Grund der gebildeten eigenen Stoffwechselprodukte erfolgte, habe ich nie innerhalb der Versuchszeit beobachtet. Nun ist es denkbar, daß eine Erschöpfung der Mineralsalze eintritt, doch deutet im Kurvenbilde nichts darauf hin. Es sieht so aus, als ob die Entwicklung nach der Gaserneuerung einen neuen Anstoß bekäme; dieses ist besonders beim Punkt 2 und beim Punkt 4 der Fall.

Die Unempfindlichkeit gegen die eigenen Stoffwechselprodukte ließ sich sehr einfach nachweisen.

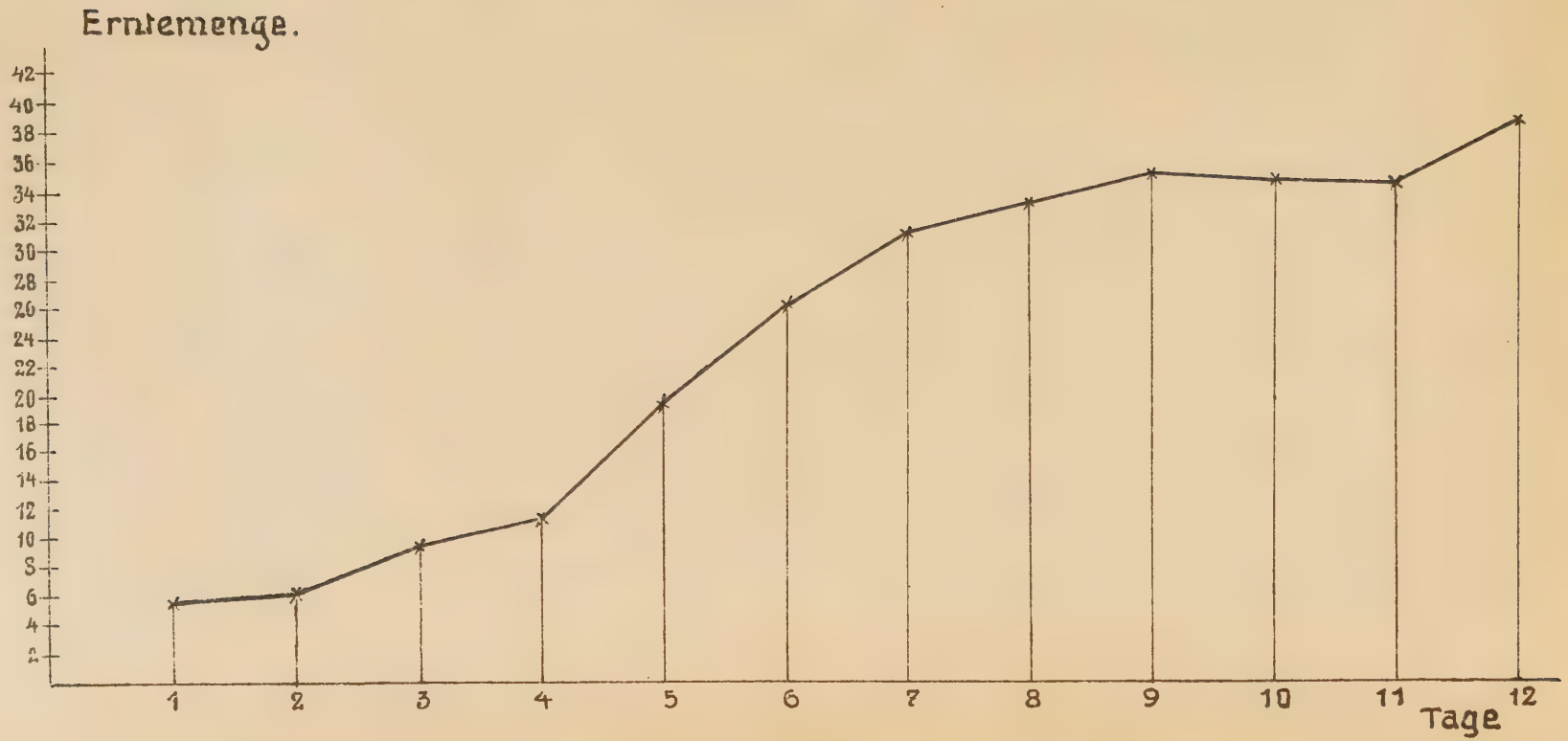
Ich benutzte hierzu einige ältere Kulturen, deren Flüssigkeiten ich durch Filtration von den Bakterienhäuten trennte; dieses ist hier leicht möglich, da in der Flüssigkeit sich so gut wie keine Bakterien aufhalten sondern nur auf der Oberfläche, wo sie zu

Entwickelung der Kultur.

34°; 33⅓ % Methan; 66⅔ % Luft.

Kulturdauer	Kulturzeit von	Kulturzeit bis	Gasfüllungen	Fläche a	Fläche b	Mittel der Flächenwerte	Verbrauch an Permanganat a	Verbrauch an Permanganat b	Mittel der Permang.-Mengen	Auf gleiche Oberfläche berechnete Permanganatmenge
1 Tag	5. Sept.	6. Sept.	1	51,4	16,7	34,1	5,8	1,8	3,8	**5,6**
2 Tage	5. „	7. „	1	46,6	45,4	46,0	5,6	5,2	5,4	**5,9**
3 „	5. „	8. „	2	24,6	18,1	21,4	4,8	3,3	4,1	**9,2**
4 „	5. „	9. „	2	46,6	46,6	46,6	10,3	10,7	10,5	**11,3**
5 „	5. „	10. „	3	24,6	46,6	35,6	10,7	19,1	14,9	**19,5**
6 „	5. „	11. „	3	16,7	16,7	16,7	9,0	8,4	8,7	**26,1**
7 „	5. „	12. „	4	18,1	17,3	17,7	10,7	11,5	11,1	**31,4**
9 „	5. „	14. „	5	16,7	25,5	21,1	11,2	17,7	14,5	**34,9**
11 „	5. „	16. „	6	10,8	24,6	17,7	7,0	17,6	12,3	**34,7**
12 „	5. „	17. „	6	46,6	24,6	35,6	33,8	20,4	27,1	**39,5**

Fig 8.
Entwicklung einer Kultur bei ⅓ Methan
u. ⅔ Luft 34°



Häuten verkleben. Diese die Stoffwechselprodukte enthaltende nahezu klare Flüssigkeit versah ich mit frischen Zusätzen von Mineralsalzen, füllte sie dann in die Kulturschälchen und sterilisierte. Dann impfte ich wieder von jüngeren Kulturen ab und brachte die Schälchen in die übliche Methan-Luft-Atmosphäre. Das Wachstum stellte sich von neuem ein und zeigte gar keinen Unterschied gegenüber dem gewöhnlichen Verhalten neu angelegter Kulturen.

Daß in allen Kurvenbildern Unregelmäßigkeiten vorkommen, kann seinen Grund nur in der Addierung von kleinen Fehlern haben, die trotz aller Vorsicht doch nicht ganz ausgeschaltet werden können. Der Luftdruck der Atmosphäre ändert sich ständig. Beim Impfem der Kulturen können sich ebenfalls kleine Abweichungen einstellen, und ebenso ist der Farbumschlag bei der Titration nicht absolut scharf. Im Methan ist immer noch eine geringe Menge Luft enthalten, so daß der Prozentgehalt der Gase in dieser Hinsicht noch um ein Geringes korrigiert werden müßte. Eine weitere Möglichkeit der Fehlerentstehung glaubte ich darin suchen zu müssen, daß das Methan und die Luft bezw. der Sauerstoff sich nicht homogen mischen, da beispielsweise das Methan gegen Luft das spezifische Gewicht 0,5 besitzt. Dadurch könnten ebenfalls kleine Abweichungen hervorgerufen werden insofern als ein Kulturschälchen, das sich auf dem Boden der Gasglocke befindet, nicht genau den gleichen Bedingungen unterworfen wäre wie wenn es im oberen Teil aufgestellt ist. Doch ist die Gasmischung, die durch Strömungen entsteht, infolge der Temperaturschwankungen, die mit dem Einstellen der Glocke in den Wärmeschrank verbunden sind, wohl zu rasch, als daß dieses in Betracht käme. Eher könnte im Verlauf des Versuchs die viel schwerere Kohlensäure sich unten ansammeln.

Daß die Fehler nicht durch die Methodik der Titration an und für sich entstehen, kann durch Zahlen sichergestellt werden, die diese Versuchsanstellung bezüglich ihrer Brauchbarkeit überhaupt stützen. Die auf gleiche Oberfläche umgerechneten Mengen von Permanganat betrugen in einer Reihe von Fällen bei einer Temperatur von 34° Celsius, einem Gasgemisch von $^1/_3$ Methan und $^2/_3$ Luft nach einer Zeit von vier Tagen:

8,8 ccm (bei einer Oberfläche von 41,4 qcm: 7,3 ccm Permanganat)
8,9 „ „ „ „ „ 24,6 „ : 4,4 „ „
8,9 „ „ „ „ „ 46,6 „ : 8,3 „ „
9,0 „ „ „ „ „ 34,8 „ : 5,7 „ „
9,3 „ „ „ „ „ 62,6 „ : 11,6 „ „
9,5 „ „ „ „ „ 46,6 „ : 8,7 „ „

Die Schwankungen sind also nicht übermäßig groß. Es mag außer den aufgezeigten Fehlerquellen noch andere geben; jedenfalls könnten die erwähnten genügen, um Unregelmäßigkeiten, die aus der graphischen Darstellung ersichtlich sind, hervorzubringen.

IV. Beschreibung der kultivierten Bakterien.

Methanbakterien.

Die von mir gezüchteten autotrophen Bakterien zeigten in anorganischer Nährlösung bei Anwesenheit von Methan wenig charakteristisches makroskopisches Aussehen. Die gebildete Kahmhaut besaß eine grauweiße Farbe und konnte in gewissen Fällen, bei besonderer Beleuchtung, höchstens durch einen samtartigen Schimmer auffallen; dieses beobachtete ich bei den höchsten Methanstufen (z. B. 90 % Methan) ganz besonders gut. Mikroskopisch konnten nur nach kurzer Wachstumsdauer mit Erfolg Einzelheiten erkannt werden; schon nach einer Versuchszeit von zwei Tagen stellte sich die Haut in Form eines bunten Gewirrs massenhaft übereinander liegender Bakterienleiber dar, in dem kaum ein Charakteristikum festzustellen war. Es mußten also jüngere Kulturen untersucht werden.

Das Bakterium besitzt die Form eines kurzen, dicken Stäbchens; die Länge beträgt 0,9 μ bis 2,2 μ, die Breite 0,3 μ bis 0,4 μ. Die Form des von mir isolierten Organismus' hält etwa die Mitte zwischen einem Ellipsoid und einem Zylinder. Vielfach waren Teilungen sichtbar (siehe Fig. 9). Beweglichkeit konnte nicht festgestellt werden; was mit dem Ergebnis von Söhngen übereinstimmt. Da das Bakterium auch auf organischen

Stoffen wuchs, was weiter unten noch näher ausgeführt werden wird, konnte noch über einige diagnostische Merkmale entschieden werden. So findet auf Schrägagar üppiges Wachstum statt in Form einer proteusähnlichen, am Rande fein gezackten Auflage. Werden die Bakterien in Zuckeragar-Röhrchen verteilt, so hört das Wachstum dicht unter der Oberfläche auf; Gasbildung findet dabei nicht statt. Ähnliches Verhalten ergibt sich bei Anwendung von Neutralrot-Agar, wobei keine Umfärbung vor sich geht. Lakmus-Molke zeigt Blaufärbung. Bei Traubenzucker-Lakmus-Nutrose tritt schwache Rötung auf. Milchzucker-Lakmus-Nutrose bleibt unverändert; Milch wird nicht zum Gerinnen gebracht. Bouillon wird sehr stark getrübt.

Die in Methan-Luftatmosphäre gebildeten Kolonieen auf ausgewaschenem Agar mit Zusatz anorganischer Salze sind nicht

Fig. 9.

sehr groß; anfänglich sind sie fast wassertropfenartig und besitzen nur eine schwache, graugelbe bis weiße Färbung. Die älteren Kolonieen sind dichter und massiger und daher nicht mehr durchsichtig. Der Rand besitzt kaum Ausbuchtungen und kann als glatt bezeichnet werden. Die tiefliegenden Kolonieen sind wetzsteinförmig ausgebildet und an Ausdehnung geringer als die aufliegenden Kolonieen; sie sind von Anfang an dichter und dunkler als diese. Etwas stärker ist die Ausdehnung auf Bouillon-Agar; hierbei sind die Kolonieen noch flacher als die auf anorganischem Agar. Gelatine wird nicht verflüssigt; der Gelatinestich zeigt nagelförmige Ausbildung, dicht unter der Oberfläche, im oberen Teil des Stiches, ist das Wachstum stärker als im unteren Teil und am stärksten auf der Oberfläche. Sporenbildung konnte nicht beobachtet werden, weder in alten noch in jungen Kulturen; Söhngen fand bei seinem „Bacillus methanicus“ dasselbe.

Was die Benennung des isolierten Spaltpilzes anbelangt, so ist er wegen des Mangels der Beweglichkeit und der Sporenbildung jedenfalls zur Gattung Bakterium zu rechnen. Wir geben ihm den Namen „Bacterium methanicum“ Münz*), ohne uns in Bezug auf die Identität mit dem von Söhngen kultivierten „Bacillus methanicus“ zu binden, worauf unten zurückzukommen ist.

Begleitbakterien.

Die in der Rohkultur auftretende Trübung der Flüssigkeit rührt von den Bakterien her, welche sich von den organischen Stoffen zu nähren vermögen, die durch die Verarbeitung des Methans in die anfänglich anorganische Lösung gelangen. Wahrscheinlich ist die Auffassung Söhngens, daß die fluoreszierenden Bakterien und Bacillus pyocyaneus ebenfalls Methanzehrer sind, und deshalb in den Kulturen der Methanbakterien mit angehäuft werden, auf diesem Wege zustande gekommen. Ich erhielt verschiedentlich beim Überimpfen von der Rohkultur auf eine sterile anorganische Nährlösung nach kurzer Zeit in Methanatmosphäre eine sehr starke Trübung. Durch wiederholtes Plattengießen stellte ich fest, daß es sich um fluoreszierende Bakterien handelte. Der Beweis, daß die von den Methanbakterien gebildeten Stoffe für das Wachstum der Fluoreszenten genügte, wurde auch auf andere Weise erbracht. Ich impfte in abfiltrierte Nährlösung, in der Methanbakterien kultiviert worden waren, nach Sterilisieren der Lösung von Reinkulturen von Bacillus pyocyanëus und Bacillus fluorescens liquefaciens ab und kultivierte sie im Thermostaten an der Luft und in Methan-Luft-Atmosphäre. In ähnlicher Weise wurde auf sterile Nährlösung geimpft, in der keine Methanbakterien kultiviert worden waren, und die Hälfte der Kulturen unter Methan-Luft gehalten, die andere Hälfte an der Luft. Diese letztgenannten Kulturen, die keinen Kohlenstoff enthielten, wuchsen nicht und zwar weder mit Methan noch ohne Methan. Das beweist, daß also Methan von den oben genannten Bakterien nicht verarbeitet werden kann. Die auf die Lösung mit Stoffwechselprodukten der Methanbakterien geimpften Bakterien zeigten deutliches Wachstum und zwar sowohl mit Methan als ohne Methan. Ich wählte nun ein Substrat, auf dem sich die genannten Bakterien besonders

*) Der isolierte Stamm wird der Kralschen Sammlung überwiesen.

stark entwickeln: Fleischwasser-Agar mit Zusatz von Pepton, Kaliumnitrat und Ammoniumsulfat (nach Arthur Meyer). Die ersten Versuche, welche mit Agarröhrchen in einem Erlenmeyerkolben vorgenommen wurden, der in der Art des bei der Rohkultur der Methanbakterien verwendeten hergerichtet war, ergaben, daß zwar deutliche Gasaufnahme festgestellt werden konnte, doch schien mir das Volumen der übergesogenen Flüssigkeit zu gering zu sein, um die Garantie zu bieten, daß es sich um die Absorption von Methan handelte. Um stärkere Gasaufnahme zu erzielen, brachte ich nun eine möglichst große Zahl von Kulturen zur Entwickelung. Ich wählte außerdem einen möglichst kleinen Gasraum, um eine rasche Erschöpfung der Gase zu erreichen. Der Versuch wurde vier Mal wiederholt. Das Wachstum dieser farbstoffbildenden Bakterien setzte schnell und stark ein, wobei ein erhebliches Volumen Flüssigkeit nachgesogen wurde. Allmählich wurde das Wachstum schwächer und blieb schließlich ganz stehen. Bei der Berechnung der absorbierten Gasmenge stellte sich heraus, daß in allen vier Fällen dieses Volumen annähernd gleich der Quantität des in der vorhandenen Luftmenge enthaltenen Sauerstoffs war.

Durch diese Versuche scheint mir der Beweis erbracht, daß zwar sowohl Bacillus pyocyanëus als Bacillus fluorescens liquefaciens in den Kulturen der Methanbakterien mit angehäuft werden können, daß sie aber zu autotropher Ernährung nicht fähig sind und kein Methan aufnehmen können. Wenn bei 90% Methan und 10% Luft diese Bakterien noch verhältnismäßig gut gedeihen, wie es auch bei mir verschiedene Male der Fall war, so ist allerdings ein Irrtum leicht möglich, der aber einwandfrei aufgeklärt worden ist.

Verschiedentlich fand ich in den Rohkulturen ein anderes, eigentümliches Bakterium, das ebenfalls auf den Stoffwechselausscheidungen der Methanbakterien zu wachsen vermag. Ich konnte es in Flüssigkeitskulturen mit Zusatz der nötigen Mineralsalze und verschiedener organischer Stoffe gut zur Entwicklung bringen. Folgende organische Substanzen wurden in 0,1%iger Lösung geboten:

1. Natriumtartrat
2. Natriumbutyrat
3. Natriumacetat
4. Glukose
5. Saccharose
6. Mannit
7. Glycerin
8. Pepton
9. Asparagin.

In allen Fällen zeigte sich eine Trübung der Flüssigkeit und ein hellrosa gefärbter Bodensatz; besonders bei 3, 4, 5, 6 und 7 war starkes Wachstum vorhanden. Alle Flüssigkeiten reagierten nach der Kultur der Bakterien sauer.

Auf Bouillon entsteht eine weißliche Haut. Der Stich in Zuckeragar ist nagelförmig, oben gewulstet; Gasbildung ist hierbei nicht vorhanden. Auf Neutralrot-Agar entwickeln sich die Bakterien in Form einer roten Auflage. Auf Milch bildet dieser Organismus eine hellorange gefärbte Haut; Gerinnung konnte nicht festgestellt werden. Lakmusmolke zeigt Blaufärbung, während Traubenzucker-Lakmus-Nutrose unverändert bleibt. Auch Milchzucker-Lakmus-Nutrose weist keine Veränderung auf. Das Bakterium bildet auf organischem Agar schön ziegelrote Kolonien und vermag schon auf ausgewaschenem Agar bei Anwesenheit der nötigen Mineralsalze ohne Zusatz organischer Stoffe zu gedeihen. Auf Bouillon-Agar wird ein außerordentlich starkes Wachstum entfaltet. Die Kolonieen auf Agar mit bloßem Zusatz anorganischer Salze zeigen eine eigentümliche Art des Wachstums, indem sich die Bakterien in sich verzweigenden Ausläufern ausbreiten. Es handelt sich hier also nicht nur um einen gelappten oder gezahnten Rand der Kolonien, sondern um das Vorschieben einzelner Fäden. Auf Agarkulturen mit Pepton, Zuckerarten und Salzen organischer Säuren nimmt die Kolonieenbildung fast das Aussehen von Pilzkulturen an, während auf Schrägagar dicke Wülste gebildet werden. Die Form des Bakteriums ist wenig auffällig; es ist ein kurzes, dickes, unbewegliches Stäbchen, das auf Ausstrichen von Agarkulturen in unregelmäßigen, perlschnurartigen Kokkenreihen erscheint.

Ob das Bakterium schon bekannt ist, vermag ich nicht zu sagen, da mir die Identifizierung nicht gelungen ist. Dieses rote Bakterium wuchs, als es auf die Stoffwechselprodukte der Methanbakterien geimpft wurde, verhältnismäßig gut.

V. Ersatz der Stoffe.

Vertretung des Methans durch andere Gase.

Leuchtgas.

Da dieses Gas beträchtliche Mengen von Kohlenwasserstoffen enthält, lag es nicht fern, deren Verwertbarkeit für die Methanbakterien zu untersuchen. Ich setzte zu diesem Zweck zwei Versuche an. Je sechs Kulturschälchen wurden im ersten Fall in ein Gasgemisch von $^2/_3$ Luft und $^1/_3$ Leuchtgas, im zweiten Fall in ein solches von $^1/_3$ Luft und $^2/_3$ Leuchtgas gebracht. In beiden Fällen erhielt ich gutes Wachstum. Bei $^1/_3$ Leuchtgas und $^2/_3$ Luft wurden in vier Tagen bei 34° 24 ccm des Gasgemischs absorbiert. Zur weiteren Erörterung sei hier die ungefähre Zusammensetzung des Leuchtgases wiedergegeben:

Methan:	30—38 %
Wasserstoff:	36—53 %
Sauerstoff:	0—0,6 %
Kohlenwasserstoffe:	4—12 %
(Äthan, Äthylen, Acetylen u. a.	
Kohlenoxyd:	5—13 %
Kohlendioxyd:	0—3 %
Stickstoff:	0—4 %
Schwefelwasserstoff:	0—0,3 %

Die Frage ist nun, ob die neben Methan vorhandenen Gase auf die Entwickelung keinen erheblichen Einfuß ausübten, die Gasabsorption also nur durch die Anwesenheit des Methans erfolgte, oder ob auch das eine oder andere Gas von unsern Bakterien in ähnlicher Weise verwertet werden kann. Die Möglichkeit war um so eher denkbar, als Kohlenwasserstoffe wie Äthan und Äthylen eine verhältnismäßig große chemische Ähnlichkeit mit Methan haben. Um hier eine Entscheidung zu fällen, mußte die Entwickelung in den einzelnen Gasen für sich untersucht werden. Die ausgeführten Versuche beziehen sich auf Wasserstoff, Kohlenoxyd, Äthan und Äthylen; Acetylen wurde nicht in Betracht gezogen.

Wasserstoff.

Wasserstoff wurde aus reinem Zink und Schwefelsäure entwickelt. Ich stellte darauf ein Gasgemisch von 50 % Luft und 48 % Wasserstoff mit Zusatz von 2 % Kohlensäure her. Die Kulturen kamen nicht zur Entwickelung.

Kohlenoxyd.

Reines Kohlenoxyd läßt sich leicht aus Essigsäure und starker Schwefelsäure herstellen; ich griff daher zu diesem Verfahren. Wachstum konnte nicht erzielt werden. Das verwendete Gasgemisch bestand aus 50 % Kohlenoxyd und 50 % Luft.

Äthylen.

Da sich dieses Gas verhältnismäßig leicht und rein darstellen läßt, untersuchte ich es ebenfalls auf seine Verwertbarkeit. Ich entwickelte das Äthylen aus Äthylalkohol und sirupöser Phosphorsäure, die ich durch Eintragen von Phosphorpentoxyd in die käufliche Phosphorsäure erhielt. Als Entwickelungsgefäß wurde ein Glasrundkolben mit Hals verwendet, der mit Tropftrichter, Gasableitungsrohr und Ansatzstück für ein Thermometer versehen war. Der Alkohol wurde tropfenweise zu der auf 220° erhitzten Phosphorsäure zugesetzt. Das entwickelte Gas ist so rein, daß ich es nicht waschen zu müssen glaubte. Das verwendete Gasgemisch bestand aus $^2/_3$ Luft und $^1/_3$ Äthylen. Es konnte — allerdings äußerst schwaches — Wachstum festgestellt werden. Die Möglichkeit, daß doch geringe Mengen von Methan bei der Entwickelung des Äthylens mit entstehen, ist aber wohl nicht ausgeschlossen; vielleicht rührt die Spur von Bakterienwachstum davon her.

Äthan.

Das Äthan steht als gesättigter Kohlenwasserstoff dem Methan, von dem es ein Homolog ist, am nächsten. Ich stellte es, da die elektrolytische Bildung aus Natriumacetat kein von Methan freies Gas liefert, aus Äthyljodid (von Merck, Darmstadt), Äthylalkohol und Kupferzink dar. Das Kupferzink erhielt ich aus granuliertem Zink, das mit Kupfersulfat übergossen und mit Wasser und Alkohol gewaschen wurde. Gleiche Volumina Äthyljodid und Äthylalkohol wurden in dem bei der Äthylendarstellung beschriebenen Apparat schwach erwärmt; das entweichende Gas

reinigte ich durch alkoholisches Kali, Bromwasser und Natronlauge. Die Gasmischung für die Kulturen bestand aus 50% Äthan und 50% Luft. Das Ergebnis war, daß nicht eine Spur von Bakterienwachstum festgestellt werden konnte. Die Impfstellen waren bei genauer Beobachtung noch sichtbar.

Zusammenfassend kann im Hinblick auf den Versuch mit Leuchtgas gesagt werden, daß zwar die im Leuchtgas neben Methan im Wesentlichen enthaltenen Stoffe: Wasserstoff, Kohlenoxyd, Äthan und Äthylen keine Schädigung für das Gedeihen der Methanbakterien bedeuten, daß aber keines dieser Gase zu ihrer Ernährung hinreichend beizutragen vermag. Das Wachstum, das mit Leuchtgas erzielt werden kann, beruht lediglich auf dem in ihm enthaltenen Methan. Daß chemisch ähnliche Stoffe sich biologisch nicht durcheinander ersetzen lassen, ist ja eine Tatsache, die längst bekannt ist. Elemente wie Kalium, Magnesium, Eisen sind in den allerseltensten Fällen oder gar nicht durch andere, chemisch ähnliche, ersetzbar.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß es besondere Bakterien gibt, die Äthylen und Äthan als Energie- bezw. Nahrungsquelle benützen können, da zum Beispiel in dem Äthylengasometer auf der Wasserfläche eine ziemlich starke Bakterienhaut entstand; ob es sich hier jedoch nur um eine im Wasser häufig vorkommende Bakterienart handelte, wurde nicht untersucht. In diesem Fall würden die im Leitungswasser vorhandenen geringen Mengen organischer Substanz und sehr wenig Sauerstoff zum Auskommen genügen müssen.

Zu dieser Frage der Notwendigkeit bezw. Verwertbarkeit von gewissen Gasen für die Methanbakterien muß noch einiges hinzugefügt werden. So interessierte mich die Frage, welchen Einfluß Schwefelwasserstoff auf ihre Entwickelung ausübt, da ja dieses Gas in der Natur in weiter Verbreitung und gerade an den Stellen, wo Zellulose vergohren wird, in oft nicht unbeträchtlichen Mengen vorkommt als Zersetzungsprodukt von Eiweißstoffen und durch Reduktion von Sulfaten. Ein Versuch mit einem Gasgemisch von 60% Luft, 37% Methan und 3% Schwefelwasserstoff brachte das Ergebnis, daß durch die Anwesenheit des Schwefelwasserstoffs das Wachstum der Bakterien verhindert wird. Weitere Versuche, mit weniger H_2S, wurden nicht angestellt, da es sich nur um eine Nebenfrage handelt. Die Rolle der Kohlensäure bleibt nun noch festzustellen. Kohlensäure wird bei der Oxydation

des Methans durch die Bakterien gebildet. Es wäre möglich, daß sie auf das Wachstum hindernd einwirkt. Daher ließ ich die entstandene Kohlensäure durch Kalilauge aufnehmen. Zu diesem Zweck wurde ein Exsiccator verwendet, dessen Boden mit starker Kalilauge bedeckt war. Der Versuch ergab, daß durch die Entfernung des Kohlendioxyds keine Förderung des Wachstums zu erreichen ist. Die auf gleiche Oberfläche berechneten, durch Oxydation mit Permanganat festgestellten Wachstumsziffern betrugen bei vier Tagen Entwickelung 9,2; 9,8; 9,5; 9,6 und liegen zwischen 8,9 und 11,4, den normalen Zahlen für 30% Methan und 40% Methan mit dem entsprechenden Rest Luft.

Was die Haltbarkeit der Kulturen bei gänzlichem Fehlen des Methans betrifft, so sind hier deutliche Unterschiede zu verzeichnen. Jüngere Kulturen halten sich längere Zeit ohne Methan, ohne daß eine merkliche Schädigung eintritt. Einige zwei Tage alte Kulturen wurden sechs Wochen lang ohne Methan gehalten; das Wachstum wurde eingestellt: die dünne Haut nahm an Stärke nicht mehr zu. Nach sechs Wochen wurde wieder in Methan-Luft-Atmosphäre kultiviert, und es zeigte sich, daß nach wenigen Tagen das Wachstum wieder aufgenommen wurde, die Haut nahm an Dicke erheblich zu. Ich impfte von diesen Kulturen ab und erhielt die alte Lebhaftigkeit der Vermehrung. Kulturen vom Alter von vier Tagen verhalten sich etwas anders; sie gehen schon zu Grunde, wenn sie 8 bis 14 Tage ohne Methan gehalten werden.

Verwertbarkeit organischer Substanzen.

Zwei Hauptfragen können gestellt werden:

1. Ist das Methan durch organische Stoffe als Kohlenstoff- und Energiequelle ersetzbar, können sich die Bakterien also außer autotroph vielleicht auch heterotroph ernähren?
2. Wird das Wachstum bei Gegenwart von Methan durch organische Stoffe, etwa durch Stickstoffverbindungen, gefördert?

Organische Stoffe als Nahrungs- und Energiequelle.

Als Kohlenstoffquellen bot ich verschiedene Gattungen organischer Verbindungen an: Salze organischer Säuren, Alkohole

und Kohlehydrate. Von organischen Säuren wurden die untengenannten benutzt, weil sie häufig in der Natur vorkommen, Essigsäure und Buttersäure besonders auch dort, wo Methan entsteht durch die Gährung von Cellulose. Von Alkoholen kamen die leicht beschaffbaren, nicht giftigen in Anwendung, von Zuckern die genannten, weil sie die häufigsten sind. Ich brachte außer den anorganischen Mineralsalzen 0,1% folgender Stoffe in Lösung:

Calciumtartrat	Mannit
Natriumbutyrat	Glukose
Natriumacetat	Saccharose.
Glycerin	

Alle Lösungen wurden vorher auf saure Reaktion geprüft, gegebenenfalls neutralisiert, dann sterilisiert und nach dem Impfen aus einer Reinkultur bei 34° aufgestellt. Sämtliche Lösungen zeigten eine schwache Trübung nach vier Tagen Entwicklungsdauer, abgesehen davon, daß die Calciumtartratlösung schon vor der Kultur einen Niederschlag mit Trübung der Flüssigkeit gezeigt hatte. Auch war in allen Kulturen eine Kahmhaut, allerdings von geringerer Stärke als in den autotrophen Kulturen, zu beobachten. Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß überall Bakterien vorhanden waren. Nach Überimpfen von diesen Kulturen in anorganische Nährlösung erhielt ich das gewohnte Wachstum bei Anwesenheit von Methan. Hiermit ist erwiesen, daß die Methanbakterien, die von mir untersucht wurden, nicht autotroph leben müssen sondern auch heterotroph gedeihen können.

Organisch gebundener Stickstoff.

Bei diesen Versuchen wurde die anorganische Stickstoffquelle, NH_4Cl, fortgelassen und 0,1% Asparagin, Pepton oder Leucin beigefügt. Das Wachstum in Asparagin ohne CH_4 war sehr mäßig, noch geringer das in Leucin; nur mit Pepton war eine etwas stärkere Entwicklung zu erreichen.

Anwesenheit von Methan und organischen Stoffen.

In einer anderen Versuchsreihe wurde außer organischen Verbindungen auch noch Methan geboten; eine Titration war nun allerdings nicht möglich. Der Augenschein, soweit man ihn als zuverlässig bezeichnen kann, zeigte, daß eine Förderung der in Methanatmosphäre ohnehin ja schon sehr rasch wachsenden

Kulturen durch organische Stoffe nicht erreicht werden kann, wenigstens, was die von mir verwendeten Substanzen anbelangt; also auch nicht durch organisch gebundenen Stickstoff gegenüber Ammoniumchlorid.

VI. Erörterung der Ergebnisse.

Die Ergebnisse im Hinblick auf den bisherigen Tatsachenbestand.

Vergleicht man die neuen Ergebnisse mit dem, was bisher von den Methanbakterien („Bacillus methanicus" nach N. L. Söhngen) bekannt war, so liegt die Frage nahe, inwiefern das Gefundene mit diesem übereinstimmt und inwiefern es etwa davon abweicht.

Söhngen gibt an, daß bei 30°—34° die Methanbakterien am besten gedeihen; das stimmt mit dem von mir gefundenen Optimum von etwa 34° überein. Auch die angegebenen anorganischen Nährlösungen (Söhngen: $MgNH_4PO_4$ = 0,1 %, K_2HPO_4 = 0,05 %, $CaSO_4$ = 0,01 %; Kaserer; NH_4Cl = 0,1 %, K_2HPO_4 = 0,05 %, $MgSO_4$ = 0,02 %, eine Spur Eisen) wurden mit gutem Erfolg verwendet. Das von Söhngen gefundene Optimum von $^1/_3$ Methan und $^2/_3$ Luft konnte ich nicht bestätigt finden; Söhngen gibt die begründenden Versuche dafür nicht an. Die Kurven zeigen im Gegenteil einen viel höheren Methangehalt bezw. geringeren Sauerstoffgehalt für Fälle besten Wachstums. Ich fand, daß Licht keinen Einfluß auf die biologische Absorption des Methans hat; diese Festellung ist in Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen bei entsprechender Untersuchung. In der Farbe der Bakterienhaut konnte ich keine dem bisherigen Tatbestand entsprechende Gleichheit oder Ähnlichkeit feststellen. Zwar waren die in der Rohkultur auftretenden Bakterienhäute bei mir nicht immer gleich gefärbt. 15 bis 20 Mal setzte ich Rohkulturen an; die „deutlich rotbraune" Färbung, von der Söhngen spricht (a. a. O. S. 515), trat in der Tat zwei oder drei Mal in Kulturen auf, doch erhielt ich sie später trotz aller Bemühungen nicht wieder: die Häute waren stets mehr oder

weniger grau bis weiß gefärbt. Ich versuchte in diesem Punkte die verschiedensten Erklärungen. So hielt ich es für möglich, daß die verschiedene Methandarstellung für diese Differenzen verantwortlich gemacht werden könnte. Ich setzte nun 12 Rohkulturen mit gleicher Nährlösung und gleichem Gasgemisch-Prozenten an:

3 Kult. m. d. aus Natriumacetat u. Baryt erhaltenen ungereinigt. CH_4;
3 „ „ „ „ Natriumacetat u. Baryt „ gereinigten „
3 „ „ „ „ Aluminiumcarbid „ ungereinigt. „
3 „ „ „ „ Aluminiumcarbid „ gereinigten „

Trotzdem erhielt ich keine Färbungsunterschiede. Vielleicht konnte die Verschiedenheit der Nährlösung an den Differenzen schuld sein: im einen Fall $Mg\,NH_4\,PO_4$, im andern Fall $NH_4\,Cl$. Auch hierin lag die Ursache nicht, wie ich leicht durch den Versuch feststellen konnte. Nun blieb noch die Möglichkeit, daß die braune Färbung von irgendwelchen anderen in der Rohkultur mit angehäuften Bakterien herrührte; ich dachte hierbei an die öfter auftretenden oben beschriebenen roten Bakterien (vgl. S. 46). Nachdem ich festgestellt hatte, daß diese auf den von den Methanbakterien gebildeten Stoffwechselprodukten zu gedeihen vermögen, impfte ich in eine angewachsene Kultur von Methanbakterien von diesen roten Bakterien mit hinein. Doch zeigte sich auch keine Bräunung; die von den mit eingeimpften Bakterien gebildete Haut nahm nur eine schwache Rosafärbung an. Falls die Braunfärbung von irgend einer beigemengten Bakterienart herrührte, konnte es also nicht die erwähnte sein. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die braune Färbung — ob sie bei Söhngen auch in der Reinkultur auftrat, vermag ich nicht aus den Angaben zu entnehmen — von einem anderen Methanbakterium herrührte als dem, das ich in Reinkultur brachte. Diese Möglichkeit scheint mir nicht fern zu liegen; auch Giglioli und Masoni weisen auf die Wahrscheinlichkeit hin, daß es mehrere Arten von Methanbakterien gibt, obschon sie zu keinem sicheren Ergebnis kommen. Die Frage, ob das von mir untersuchte Bakterium identisch mit dem von Söhngen bearbeiteten bezw. festgestellten ist, muß also, da eine sichere Identifizierung nach Söhngen nicht möglich ist, offen bleiben; auch andere Befunde stimmten ja nicht mit den von mir gefundenen überein.

Daß das Methan durch organische Stoffe verschiedener Art ersetzbar ist, steht im Einklang mit den Ergebnissen Söhngens bei „Bacillus methanicus“.

Die Lebensweise in der Kultur und unter natürlichen Bedingungen.

Die ökologische Fragestellung faßt eine vergleichende Betrachtung der durch das Experiment gefundenen Bedingungen mit den in der Natur vorhandenen in sich. Eine gute Übereinstimmung ergibt sich bezüglich der Beschaffenheit des unter natürlichen Bedingungen entstehenden Sumpfgases mit dem gefundenen Optimum des Methan- bezw. Sauerstoffgehaltes. Die chemische Analyse hat gezeigt, daß das Sumpfgas einen außerordentlich hohen Prozentsatz Methan enthält, wie ich mich selbst an einer Anzahl von Sumpfgasuntersuchungen überzeugte, so daß für die Methanbakterien in dieser Beziehung sehr günstige Bedingungen vorhanden sind. In Übereinstimmung damit bemerkte ich in Methangasometern ohne absichtlich zugefügten Sauerstoff oft dicke Häute von Bakterien, die wohl nur als Methanbakterien zu deuten sind. Da das Methan am Grund der Gewässer unter anaëroben Bedingungen entsteht, sind ihm von vornherein kaum nennenswerte Sauerstoffmengen beigemischt. Beim Weiterdiffundieren in höhere Wasserschichten kommt es in Regionen, die von der Wasseroberfläche ebenfalls nur geringe Sauerstoffmengen zugeführt erhalten, so daß die Methanbakterien hier auskömmliche Bedingungen finden. Daß die Methanbakterien von Licht unabhängig sind, läßt sich sehr gut in Einklang bringen mit den natürlichen Verhältnissen, wo sehr häufig das an die Oberfläche steigende Sumpfgas durch schwimmende Pflanzenteile bezw. Wasserpflanzen aufgehalten und verdunkelt wird. Ihr Vorkommen an der Oberfläche von grünen Pflanzen ist durch deren Sauerstoffproduktion begreiflich. Wenig Übereinstimmung ergibt sich in Bezug auf den gefundenen optimalen Wärmegrad mit den im Freien meist gegebenen Bedingungen; das durch den Versuch festgestellte Optimum liegt höher als man erwarten sollte. Das Wachstum der Methanbakterien geht demnach unter natürlichen Bedingungen viel langsamer vor sich; auch hier liegt also das Temperaturoptimum, wie für viele Or-

ganismen, z. B. auch die Zellulosevergährer, höher als es den natürlichen Bedingungen entspricht.

Da auch organische Stoffe verwertet werden können, ist den Methanbakterien das Überdauern solcher Zeiten, in denen kein Methan zur Verfügung steht, gesichert. Durch den Methanverbrauch wirken sie im Sinn einer gewissen Ergänzung zu den Methangärungserregern, die die von der Pflanze hergestellte Cellulose spalten und so die Riesenmengen pflanzlicher Abfallprodukte wieder in Substanzen umwandeln, die für Organismen besser verwertbar sind. Während die hierbei erzeugte Kohlensäure von den Pflanzen aufgenommen wird und so wieder einen nützlichen Faktor darstellt, kommt das Methan den Methanbakterien zugute, durch deren Stoffwechsel lösliche organische Stoffe entstehen, die wiederum anderen Organismen nutzbar gemacht werden, als Beispiel brauchen nur die obengenannten Methanbakterien-Begleiter, Bacillus pyocyanëus und Bacillus fluoreszens liquefaciens, sowie das erwähnte ziegelrote Bakterium angeführt zu werden. Vor allem aber wird aus dem Methan neben Wasser wieder das für grüne Pflanzen verwertbare Kohlendioxyd. So bedeutet die Tätigkeit der Methanbakterien ein wertvolles Glied in dem verwickelten Getriebe des Lebens.

Vergleich mit anderen autotrophen Bakterien.

Ein vor kurzer Zeit erschienener Aufsatz von Lieske (10) beschäftigt sich näher mit der Frage der Autotrophie von Bakterien; er leistete mir gute Dienste bei dieser vergleichenden Feststellung.

Winogradsky fand 1899, daß es Bakterien gibt, die fähig sind, ohne jede organische Nahrung Ammoniak zu Nitrit bezw. Nitrit zu Nitrat zu oxydieren (9); ihre einzige Kohlenstoffquelle ist die Kohlensäure. Organische Stoffe bewirken bei den Nitratbakterien starke Hemmung des Wachstums und sind nicht zur Ernährung verwertbar. Überhaupt sind von den autotrophen Bakterien Nitrobakterien, Eisenbakterien und farblose Schwefelbakterien nicht fähig, organische Stoffe zu verarbeiten und sind daher obligat autotroph zu nennen. Die beiden übrigen autotrophen Bakteriengruppen, die Wasserstoffbakterien und Methanbakterien sind demgegenüber zu heterotropher Ernährung befähigt. Bei den obligat autotrophen Bakterien können immerhin noch Unterschiede im Verhalten gegen organische Stoffe festgestellt

werden. Während die Nitratbakterien durch organische Stoffe geradezu geschädigt bezw. getötet werden, sind die von Lieske untersuchten Eisenbakterien (14) (Spirophyllum ferrugineum) imstande, geringe Konzentrationen von organischen Stoffen zu ertragen. Ähnlich verhalten sich die von Keil (11) in Reinkultur gebrachten farblosen Schwefelbakterien, Beggiatoa und Thiothrix. Auch die Nitratbakterien können sich an organische Stoffe anpassen, wenngleich sie diese nicht verwerten. Bei Leptothrix ochracea ist das Verhalten noch nicht völlig geklärt. Die von Nathansohn entdeckten, von Beijerinck und Lieske weiter untersuchten Thiosulfatbakterien vermögen gleichfalls organische Stoffe ohne Schädigung zu ertragen.

Über die zu heterotropher Ernährung befähigten Bakterien kann zum Teil nur mit Vorbehalt geurteilt werden. Die von B. Niklewski (13) über die Wasserstoffbakterien ausgeführten Untersuchungen ergaben, daß diese imstande sind, verschiedene organische Stoffe, von denen Niklewski etwa 20 verschiedene anwendete, zu verarbeiten. Wasserstoff konnte in diesem Falle entbehrt werden. Allerdings handelt es sich bei der Tätigkeit dieser Wasserstoffbakterien nicht um einen einheitlichen Organismus: vielmehr sind zwei verschiedene, physiologisch von einander unterscheidbare Bakterien zur Oxydation des Wasserstoffs nötig, Hydrogenomonas flava und Hydrogenomonas vitrea, die zusammenarbeiten. Ganz geklärt scheint die Frage noch nicht zu sein. Die zweite Gruppe, die hier in Betracht kommt, die Methanbakterien, sind also die einzigen, die sicher nur fakultativ autotroph sind. Die Tabelle in der Keilschen Arbeit (11) über die autotrophen Bakterien kann also in diesem Sinne vervollständigt werden.

VII. Zusammenfassung.

Zum Schluß mögen die erzielten Ergebnisse zusammengestellt werden. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben folgendes:

1. Das Vorhandensein von Methanbakterien wird bestätigt.
2. Die zum Gedeihen erforderliche Temperatur liegt zwischen 18° und 40° Cels.; das Optimum liegt bei etwa 34° Cels.
3. Licht hat keinen Einfluß auf die Methanabsorption.

4. Vermehrung und Methanverbrauch findet in allen Gemischen von Methan und Sauerstoff statt, am besten bei hohem Methan- und niedrigem Sauerstoffgehalt.
5. Sauerstoff ist zum Wachstum unbedingt nötig, die Methanbakterien sind also aërob; die besten Ergebnisse sind mit wenig Sauerstoff erreichbar (etwa 2 %).
6. Die Methanbakterien vermehren sich unter autotrophen Bedingungen und erzeugen nicht unbedeutende Mengen organischer Stoffe.
7. Ein Ersatz des Methans durch andere Kohlenwasserstoffe ist nicht möglich, auch nicht durch Wasserstoff und Kohlenoxyd.
8. Das Methan ist durch verschiedene organische Kohlenstoffquellen ersetzbar; die Methanbakterien können also auch heterotrophe Lebensweise annehmen. Sowohl Alkohole als Kohlehydrate und Salze organischer Säuren bieten Ersatz für das Methan.
9. Stickstoff ist anorganisch, als Ammonsalz und als Nitrat, wie organisch verwertbar.
10. Ob die von mir isolierte Art von Methanzehrern identisch ist mit den bisher gefundenen Methanbakterien ist zweifelhaft.

Am Ende meiner Untersuchungen angelangt, spreche ich Herrn Professor Dr. Karsten meinen aufrichtigsten Dank aus für die Unterstützung, die er mir hat zuteil werden lassen, Herrn Professor Dr. Pringsheim für die Anregung, auf Grund deren die Arbeit angefertigt wurde, und die Ratschläge, die ich von ihm erhielt. In gleichem Sinne gedenke ich der Herren Professoren Vorländer und Tubandt, die mich bei chemischen Fragen berieten, und des Herrn Professor Wiese, der die Freundlichkeit hatte, mir einige Sätze aus dem Italienischen ins Deutsche zu übersetzen.

VIII. Literatur.

1) V. Urbain: „De l'élimination du méthane dans l'atmosphère"; Comptes rendues des séances de l'Académie des sciences 1901, Bd. 132, Heft 11, II. Abtlg., S. 334.

2) a) Söhngen: „Het ontstaan en verdwijen van waterstof en methaan onder den invloed van het organische leven". Dissertation Delft 1906.
b) Söhngen: „Über Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen". Bakt. Centralblatt 1906, Bd. 15, S. 513.

3) Kaserer: „Über die Oxydation des Wasserstoffes und des Methans durch Mikroorganismen". Bakt. Centralblatt 1906, Bd. 15, S. 513.

4) Giglioli und Masoni: „Nueve osservazione su l'assorbimento biologico del metano" Staz. sperim. agric. 1909, Vol. 42, p. 588.

5) Stockhausen: „Ökologie", „Anhäufungen" nach Beijernick. 1907. S. 261.

6) Erdmann: Lehrbuch der anorganischen Chemie. 1910. 4. Aufl., S. 433.

7) E. G. Pringsheim: „Über den Einfluß der Nährstoffmenge auf die Entwicklung der Pilze". Zeitschrift für Botanik 1914, 6. Jahrgang, 7. Heft.

8) F. Beilstein: „Handbuch der organischen Chemie" 1893, 3. Aufl., Bd. I.

9) Winogradsky: Annales de l'Institut Pasteur 1890, Bd. IV, S. 23; 1891, Bd. V, S. 517.

10) R. Lieske: „Kohlenstoffautotrophe Bakterien". Die Naturwissenschaften 1914, Heft 40, S. 214.

11) Keil: „Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien". Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1912, Bd. XI, S. 335.

12) Maertens: „Das Wachstum der Blaualgen in mineralischer Nährlösung“. Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1914, Bd. 12, Heft 3.
13) B. Niklewski: „Über die Wasserstoffoxydation durch Organismen“. Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik (Pringsheim) 1910, Bd. 48, S. 113.
14) R. Lieske: „Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von Spirophyllum ferrugineum Ellis, einem typischen Eisenbakterium“. Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik 1911, Bd. 49.
15) Pfeffer: „Physiologie“, Leipzig 1904, Bd. II, 2. Aufl., S. 87.

Lebenslauf.

Am 25. Februar 1891 bin ich, Eugen Münz, als Sohn des Architekts Robert Münz zu Schöneberg-Berlin geboren. Am Ende des sechsten Lebensjahres trat ich in die Vorschule der Franckeschen Stiftungen in Halle ein, besuchte hierauf kurze Zeit eine Oberrealschule in Hannover und dann sieben Jahre die Städtische Oberrealschule zu Basel. Die letzten vier Jahre meiner Schulzeit vollendete ich auf der Städtischen Oberrealschule in Halle, wo ich Ostern 1911 die Reifeprüfung ablegte. Dann begann ich meine Studien an der Universität Halle, wo ich Vorlesungen hörte bei folgenden Herren Dozenten: den Professoren Abert, Boeke, Brüel, Dorn, Eberhardt, Fitting, Fries, Gutzmer, Haecker, Japha, Karsten, Kattenbusch, Kauffmann, Krueger, Lütgert, Menzer, Pringsheim, Ruhland, Schulze-Galléra, Scupin, Stammler, Taschenberg, Uphues, Vorländer, Wangerin.

Allen meinen Lehrern, die mich in meinem Streben nach Erkenntnis und Wahrheit unterstützt und in mannigfacher Weise zur Erwerbung von Bildung und Lebensanschauung beigetragen haben, sage ich an dieser Stelle meinen aufrichtigsten Dank.